



David Pena de Sousa Santos

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS 3D EM PAPEL PARA UTILIZAÇÃO EM BIOSSENSORES

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL

Co-orientador: João Inácio, Doutor, INIAV

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente(s): Prof. Doutor Hugo Manuel Brito Águas

Vogal(ais): Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato
Doutor João José Inácio Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril 2013

Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos 3D em papel para utilização em biossensores

Copyright © 2013 – Todos os direitos reservados. David Pena de Sousa Santos. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja da do crédito ao autor e editor



Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Lab-on-Paper, contemplado com o Prémio Green Project Awards Portugal 2012 na categoria de Investigação e Desenvolvimento.

Dedico este trabalho aos meus pais que não vão deixar de me apoiar em momento algum.

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho foi necessário compreender inúmeras técnicas e fenómenos, o que só se tornou possível devido ao contacto com as pessoas que trabalham no CENIMAT. Agradeço a todas essas pessoas que me ajudaram e, em particular, à minha orientadora, Professora Elvira Fortunato, com a qual aprendi coisas que ultrapassam o necessário para o desenvolvimento de uma dissertação.

Agradeço também ao meu coorientador, Doutor João Inácio, pelo seu acompanhamento e transmissão de conhecimento durante o trabalho realizado, bem como ao seu colega, Dr. Jacinto Gomes, que sempre nos apoiou e recebeu nas visitas ao INIAV.

O trabalho apresentado foi desenvolvido num ambiente de cumplicidade e entreaajuda, próprio de um grupo que luta por objetivos comuns. É por isso que agradeço, com um carinho especial, ao Bruno, ao Jorge e à Mafalda. Agradeço também à Renata e à Rubiane, alunas brasileiras que fizeram parte do grupo durante algum tempo, pela sua ajuda em diversas montagens experimentais.

Só é possível trabalhar e atingir objetivos se houver condições anímicas para o conseguir, portanto queria agradecer à minha família e aos meus amigos pelo apoio constante e o interesse sobre o meu trabalho. Destas pessoas tenho que destacar a minha mãe, o meu irmão e a Ana pela paciência que tiveram durante este processo. Muito obrigado.

Resumo

Os métodos de detecção de marcadores, que indiquem estados patológicos, devem ser rápidos e quantitativos para assegurar um diagnóstico fiável, de maneira a permitir um tratamento eficaz e, assim, diminuir o impacto da doença na população. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu diretrizes, como o baixo custo e a independência de infraestruturas, para o desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico. Neste trabalho, foram desenvolvidos biossensores de papel em formato 3D que respeitam não só as diretrizes anteriormente indicadas como acrescentam características tais como a acessibilidade e biodegradabilidade dos seus materiais e, também, a possibilidade de aplicação em diversas finalidades, incluindo o diagnóstico na ausência de laboratório e a monitorização ambiental. Os dispositivos microfluídicos desenvolvidos são fabricados através da sobreposição de camadas de papel, padronizadas com canais hidrófilos confinados por barreiras hidrófobas, impressas através de uma impressora a cera e difundidas no papel, através de uma placa de aquecimento. As camadas de papel estão unidas por uma camada de adesivo de dupla face hidrófoba com orifícios, preenchidos por pó de celulose, que garantem o contacto em zonas específicas. Estes dispositivos permitem o fluxo vertical de soluções, algo que os dispositivos em formato 2D não possibilitam, que tem a vantagem de permitir a quantificação simultânea de vários marcadores num dispositivo com uma área menor. Para além de estudos efetuados para a otimização da construção dos dispositivos 3D, foi efetuada uma aplicação para a detecção e quantificação de glucose em soluções aquosas. Os resultados dos biossensores foram analisados através de um scanner comercial, o que permitiu uma quantificação química através de reações colorimétricas. Os biossensores 3D mostraram-se capazes de, em poucos minutos, quantificar concentrações de glucose entre 0,1 mM e 20 mM, valores que abrangem o intervalo de interesse biológico. Os dispositivos microfluídicos estudados também se mostraram capazes de resultados mais homogêneos em comparação com os conseguidos em dispositivos de fluxo lateral (2D).

Abstract

Rapid and quantitative methods for the detection of disease markers are necessary for prompt and effective diagnosis and treatment, allowing a reduction of the impact in the general population. The World Health Organization (WHO) has established guidelines for the development of new inexpensive and infrastructure independent diagnostic technologies. The core in this project was the development of a 3D paper-based technology that not only meets all the included criteria, but also gathers the use of the worldwide available non-polluting materials. Additionally, it has the ability to be useful in a variety of applications, including point-of-care diagnostics and environmental monitorization. This recent class of analytical devices is fabricated by layering paper patterned by printed and melted wax, which allows the creation of hydrophilic channels. The paper layers are bonded by cellulose powder and hydrophobic patterned adhesive, allowing the connection between different layers in specific zones. This technology extends paper-based assays from simple 2D to 3D devices with complex microfluidic paths, introducing the ability to quantify multiple analytes simultaneously in a smaller area. This inexpensive paper-based microfluidic technology, coupled with simple and inexpensive digital image analysis, allowed a rapid (few minutes) quantification of glucose concentration between 0.1 mM and 20 mM, a range that covers clinically relevant concentrations. Furthermore, adding this degree of freedom to the flow movement translates into a capacity to obtain better results comparing to those based on 2D designs for glucose quantification by colorimetric reactions.

Lista de Acrônimos

AFP – Alfa feto proteína

AKD – *Alkyl ketene dimer*

ALP – Fosfatase alcalina

ASSURED – *Affordable, Sensitive, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment free and Delivered to those in need*

AST – Alanina transaminase

ATR – Refletância total atenuada

BSA – Albumina de soro de bovino

CA125 – Antígeno carboidrato 125

CA199 – Antígeno carboidrato 199

CEA – Antígeno carcinogênico embrionário

CENIMAT – Centro de Investigação de Materiais

CRT – Tubo de raios catódicos

CXA – Analisador computadorizado de raios-X

EDS – Espectroscopia dispersiva de raios-X

FRX – Fluorescência de raios-X

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

LFA – Dispositivos de fluxo lateral

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PDMS – Polidimetilsiloxano

POC – *Point-of-Care*

SEM – Microscopia de varrimento por elétrons

XDR – Difração de Raios-X

μPAD – Dispositivos de análise de microfluídica em papel

Lista de Símbolos

°C – Graus Celsius

Ca – Cálcio

Cl – Cloro

cm – Centímetro

d – Difusão

d – Distância entre planos cristalinos

D – Poro médio

d(t) – Distância

k – Constante

keV – Kilo Eletrão Volt

kV – KiloVolt

M – Molar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

n_i – Número de reflexão

ppm – Partes por milhão

S - Enxofre

s – Segundo

t – Tempo

U – Unidades

X_{CR} – Índice de cristalinidade

Z – Número atômico

γ – Tensão superficial

γ_{GL} – Tensão superficial da interface gás-líquido

γ_{GS} – Tensão superficial da interface gás-sólido

γ_{LS} – Tensão superficial da interface líquido-sólido

η – Viscosidade

Θ – Ângulo de Bragg

Θ_c - Ângulo de contacto

λ – Comprimento de onda do feixe incidente

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

Índice de Matérias

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract.....	XI
Lista de Acrónimos	XIII
Lista de Símbolos	XV
Índice de Matérias	XVII
Índice de Figuras	XIX
Índice de Tabelas	XXV
Enquadramento e Objetivos	XXVII
1. Introdução.....	1
1.1. Microfluídica.....	1
1.2. Microfluídica em papel.....	3
1.2.1. Papel.....	3
1.2.1.1. Composição do papel	4
1.2.1.2. Fabricação do papel	6
1.2.2. Fabricação de dispositivos de microfluídica em papel	7
1.2.2.1. Dispositivos de formato 3D.....	9
1.3. Biossensores	10
1.3.1. Biossensores em papel	11
1.3.2. Glucose.....	12
2. Técnicas de caracterização.....	15
2.1. Fluorescência de raios-X.....	15
2.2. Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier	16
2.3. Difração de raios-X.....	17
2.4. Ângulo de contacto.....	18
2.5. Microscopia eletrónica de varrimento.....	19
2.5.1. Espectroscopia dispersiva de raios-X	21
3. Caracterização dos materiais	23
3.1. Materiais hidrófilos.....	23
3.1.1. Espectroscopia dispersiva de raios-X	23
3.1.2. Fluorescência de raios-X.....	25
3.1.3. Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier	26
3.1.4. Difração por raios-X.....	28
3.1.5. Microscopia eletrónica de varrimento.....	30

3.1.6.	Ângulo de contacto	31
3.2.	Materiais hidrófobos	32
3.2.1.	Ângulo de contacto	33
3.2.2.	Microscopia eletrónica de varrimento.....	34
4.	Desenvolvimento de biossensores 3D	37
4.1.	Montagem de um biossensor 3D	37
4.2.	Interação entre papel e cera.....	39
4.2.1.	Canais - difusão da cera no papel.....	39
4.2.2.	Encapsulamento dos canais.....	41
4.2.2.1.	Materiais e Procedimento experimental	41
4.2.2.2.	Análise e discussão de resultados	42
4.3.	Influência da orientação do substrato de papel no ensaio de microfluídica	45
4.3.1.	Materiais e Procedimento experimental	45
4.3.2.	Análise e discussão de resultados	46
4.4.	Influência da humidade relativa no ensaio de microfluídica em papel.....	49
4.4.1.	Materiais e Procedimento experimental	49
4.4.2.	Análise e discussão de resultados	49
4.5.	Interação entre papel e adesivo	50
4.5.1.	Materiais e Procedimento experimental	51
4.5.2.	Análise e discussão de resultados	52
4.6.	Interação entre papel e pó de celulose	54
4.6.1.	Quantidade de pó de celulose	54
4.6.1.1.	Materiais e Procedimento experimental	55
4.6.1.2.	Análise e discussão de resultados	56
4.6.2.	Comparação da libertação de proteína BSA entre papel Whatman nº1 e pó de celulose	58
4.6.2.1.	Materiais e Procedimento experimental	58
4.6.2.2.	Análise e discussão de resultados	61
5.	Aplicação – Detecção e quantificação de glucose	68
5.1.	Otimização de biossensores de formato 3D para a quantificação de glucose	68
5.1.1.	Materiais e Procedimento experimental	68
5.1.2.	Análise e discussão de resultados	71
6.	Conclusões e perspectivas de trabalho futuro	78
	Bibliografia	78
	Anexos.....	88

Índice de Figuras

Figura 1.1: Dispositivo de microfluídica construído em PDMS e vidro. Os canais têm 200 µm de largura e 130 µm de altura com um offset de 30 µm. As obstruções em forma de diamante têm 100 µm de altura e largura.	2
Figura 1.2: Estrutura química dos compostos presentes nas paredes das células vegetais (adaptado de [18–20]).	5
Figura 1.3: Canal de microfluídica em papel de filtro criado através do método de impregnação de parafina desenvolvido por Müller <i>et al.</i> em 1949 [10].	7
Figura 1.4: Blocos de tinta sólida (cera) da marca Xerox.	9
Figura 1.5: Dispositivo de microfluídica em papel com formato 3D. A primeira camada do dispositivo contem quatro zonas de depósito de amostra. À direita da figura está a última camada do dispositivo, que possui sessenta e quatro zonas de teste. Este dispositivo tem 2 cm de lado (adaptado de [34]).	10
Figura 1.6: Biossensor µPAD de papel sensível a glucose e proteína (BSA) [12].	12
Figura 1.7: Reações enzimáticas utilizadas para quantificar a concentração de glucose presente numa solução biológica.	13
Figura 2.1: Equipamento FRX utilizado neste trabalho: PANalytical XRF WDS 4kW AXIOS	15
Figura 2.2: Equipamento FTIR Nicolet 6700 FT-IR DA THERMO ELECTRON CORPORATION com módulo ATR SMART iTR com cristal de diamante da Thermo Scientific.	16
Figura 2.3: Esquema de difracção do feixe incidente pelos planos cristalográficos do material [60]....	17
Figura 2.4: Equipamento de DRX utilizado neste trabalho: X'Pert PANalytical.	18
Figura 2.5: Relação entre o ângulo de contacto e as diferentes tensões superficiais das interfaces do sistema.	18
Figura 2.6: Equipamento OCA 20 da marca Data Physics utilizado para determinar os ângulos de contacto dos sistemas analisados.	19
Figura 2.7: Equipamento de SEM CARL ZEISS AURIGA CROSSBEAM SEM-FIB utilizado neste trabalho.	20
Figura 3.1: A) Imagem SEM da zona de papel analisada por EDS; B) Espectro de EDS de papel, cortado a E=5 keV; C) Mapeamento de carbono na amostra de papel; D) Mapeamento de oxigénio na amostra de papel.	24
Figura 3.2: A) Imagem SEM da zona de pó de celulose analisada por EDS; B) Espectro de EDS de pó de celulose, cortado a E=5 keV; C) Mapeamento de carbono na amostra de pó de celulose; D) Mapeamento de oxigénio na amostra de pó de celulose.	25
Figura 3.3: Espectros FTIR do papel Whatman nº1 e do pó de celulose.	27
Figura 3.4: Difractogramas do papel Whatman nº1 e do pó de celulose.	29
Figura 3.5: Conjunto de imagens obtidas por SEM. A) e B) papel Whatman nº1; C) e D) pó de celulose.	31

Figura 3.6: Imagens da relação entre os materiais em estudo e água. A) Papel Whatman nº1; B) pó de celulose	32
Figura 3.7: Ângulos de contacto dos sistemas em estudo: A) Adesivo G; B) Adesivo M; C) Adesivo P.	33
Figura 3.8: Ângulos de contacto dos sistemas em estudo: A) Cera impressa em papel Whatman nº1; B) Cera difundida em papel Whatman nº1.....	34
Figura 3.9: Imagens sem dos diferentes adesivos sobre papel whatman nº1: A) Adesivo G; B) Adesivo M; C) Adesivo P.....	35
Figura 3.10: Imagens SEM da cera e do papel: A) Amostra de cera; B) Cera impressa em papel Whatman nº1; C) Cera difundida em papel Whatman nº1.....	35
Figura 4.1: Preparação dos constituintes de um biossensor 3D: A) Os padrões das camadas são desenhados com recurso a software próprio; B) As camadas de papel são preparadas através da impressão a cera dos padrões desenhados e posterior difusão da cera através de uma placa de aquecimento; C) As camadas de adesivo são sujeitas a corte com recurso a uma máquina de corte a laser.	38
Figura 4.2: Montagem do biossensor 3D: 1) Zona de depósito da solução a analisar – camada de papel; 2) e 4) Camada de adesivo; 3) Camada de Papel; 5) Zona de análise – Camada de papel; 6) Poços das camadas de adesivo preenchidas com pó de celulose; 7) Biossensor 3D montado.	38
Figura 4.3: Zona de análise do exemplo de formato para biossensores 3D apresentado antes e depois do ensaio.	39
Figura 4.4: Largura das linhas após impressão e das barreiras (frente e verso do papel) após difusão a 140°C durante 2 minutos, em função da largura nominal das linhas [40].....	40
Figura 4.5: Conjunto de canais criados para o estudo da influência do encapsulamento no fluxo de fluidos: A) canais simples.; B) Canais encapsulados em 1 cm do percurso.; C) Canais encapsulados em 1,8 cm do percurso; D) Canais encapsulados e revestidos com adesivo em 1 cm do percurso; D) Canais encapsulados e revestidos com adesivo em 1,8 cm do percurso. Os canais foram criados em grupos de vinte.	42
Figura 4.6: Relação entre o tempo de percurso da solução tamponada num canal simples e em canais com diferentes condições para distâncias de 1 cm e 1,8 cm: “Simples” refere-se aos canais não encapsulados, usados como referência; “Cera” refere-se aos canais encapsulados com cera; “P” refere-se a canais encapsulados com cera e adesivo P; “M” refere-se a canais encapsulados com cera e adesivo M; “G” refere-se a canais encapsulados com cera e adesivo G.	43
Figura 4.7: Imagem SEM do encapsulamento de canais no papel. As setas indicam falhas na camada de cera impressa no papel.	44
Figura 4.8: Canal desenhado para estudar a orientação das fibras do papel Whatman nº1: A) Zona de absorção inicial; B) Conjunto de zonas de análise limitadas por referências coloridas; C) Zona de absorção final	45
Figura 4.9: Representação das orientações vertical (V) e Horizontal (H) numa folha de papel de cromatografia Whatman nº1.....	46

Figura 4.10: Velocidade média para cada intervalo de 5 mm do canal percorrido por a solução 0,1% NaCl.....	47
Figura 4.11: Tempo do fluxo de solução de 0,1% NaCl em função da distância percorrida (representada ao quadrado).....	48
Figura 4.12: Gráfico do tempo de percurso da solução tamponada em função da humidade relativa. Para os canais com 1 cm a equação linear obtida foi $y = 75,55 - 0,51x$ com coeficiente $R^2 = 0,24$. No caso dos canais com 1,8 cm a equação da regressão linear obtida foi $y = 270,52 - 2,85x$ com $R^2 = 0,60$	50
Figura 4.13: Montagem experimental para obter os dados necessários à análise das variáveis em estudo. A montagem é constituída por uma garra, uma mola, um recipiente com solução tamponada e o conjunto de canais. Utilizou-se um higrómetro para verificar as condições ambiente e cronómetro para registar os tempos de fluxo da solução para as distâncias pretendidas. O nível de solução no recipiente foi mantido com o recurso a uma pipeta 1:10 µL.	52
Figura 4.14: Tempo necessário para a solução tamponada percorrer canais em diferentes condições para: A) Adesivo P; B) Adesivo M; C) Adesivo G.	53
Figura 4.15: A) Desenho do sistema elaborado no software Microsoft Visio. É formado por dois conjuntos de 20 canais com $3,3 \times 30 \text{ mm}^2$ com linhas de $300 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura e por uma camada com o propósito de criar orifícios no adesivo. A cor amarela não corresponde à realidade sendo um auxílio de interpretação; B1) Sistema montado após o processo de aquecimento das camadas de papel impressas e customização da camada de adesivo; B2) Zonas hidrófobas de b1: zonas do papel onde a cera se difundiu e camada de adesivo trabalhada de maneira a possibilitar o contacto entre as camadas de papel numa área específica.....	55
Figura 4.16: Fotografia da montagem dos tubos com pó de celulose para verificar o seu funcionamento bem como para relacionar o volume de canal com a quantidade de pó de celulose necessária para se estabelecer contacto entre camadas de papel. Foram construídos tubos com 2,5 mm e 5 mm de altura com 3 mm de diâmetro. Os tubos foram colados a uma base de papel e suspensos com o recurso a uma mola.....	56
Figura 4.17: Massa de pó de celulose necessária para preencher canais cilíndricos com diferentes volumes. A regressão linear obtida é $y = 0,968x$ Com um $R^2 = 0,9986$	57
Figura 4.18: Matriz desenhada no software Microsoft Visio com 5×15 poços de diâmetro 5 mm e linhas de $300 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura. A matriz foi impressa a cera e sujeita a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 minutos. .	58
Figura 4.19: Canal utilizado para o estudo de libertação de proteínas. Possui uma zona de absorção que entra em contacto com a solução que vai percorrer o canal e tem seis zonas de análise.....	60
Figura 4.20: A) Esquema do ensaio para analisar a presença de proteínas nos canais em que a fonte é pó de celulose; A.0) poço preenchido com pó de celulose; A.1) Poço com pó e proteína BSA (representado a amarelo), zona de depósito e canal a analisar antes do ensaio; A.2) Zona de depósito com solução tamponada (representada a azul); A.3) transição da solução da zona de depósito para o poço com pó e proteína BSA; A.4) Transição da solução do poço para o canal a analisar; B) Foto da	

peça suporte utilizada para o estudo. A peça de acrílico foi desenhada no software Adobe Illustrator e cortada no laser.....	61
Figura 4.21: Matriz de 5x15 poços com soluções de concentrações crescentes no sentido da numeração de proteína BSA corada com Coomassie Brilliant Blue R-250.....	62
Figura 4.22: Diferença de intensidade RGB em relação ao branco em função da quantidade de proteína BSA presente no papel. A regressão linear obtida é $y = 8,90305x + 3,25284$ com $R^2 = 0,98894$	62
Figura 4.23: Canais percorridos por solução tamponada: A) e B) canais que tiveram como fonte de proteína papel Whatman nº1. As manchas de azul intenso da figura “A” são uma consequência da utilização de adesivo para a execução do ensaio ; C) e D) Canais que tiveram como fonte de proteína o pó de celulose. A numeração indica os troços de 5 mm analisados.	63
Figura 4.24: Diferença da intensidade RGB das imagens dos canais cuja fonte de proteína é papel Whatman nº1 em relação ao branco absoluto em função das diferentes zonas do canal.	64
Figura 4.25: Diferença de intensidade RGB, em relação ao branco, em função das zonas do canal.	65
Figura 4.26: Quantidade de proteína BSA estimada para cada zona dos canais para fontes de papel e pó de celulose.	66
Figura 5.1: Esquema de procedimento para a criação das camadas constituintes de um biossensor 3D. A coluna das imagens A, B e C diz respeito ao desenho dos padrões pretendidos recorrendo ao software Adobe Illustrator: A) padrão da 1ª camada de papel - zona de depósito; B) padrão da 2ª e 3ª camada de papel – canal e zona de detecção; C) padrão da 1ª e 2ª camada de adesivo de dupla face. A coluna das imagens E, F e G diz respeito ao equipamento e parâmetros de utilização: E) Impressora de tinta sólida Xerox ColorQube 8570; F) Placa de aquecimento Heidolph MR-Hei-Tec; G) Laser Universal VLS 3.50. Na última coluna, formada por as imagens H, I e J, são apresentadas as fotos das camadas finalizadas: H) foto da 1ª camada de papel - zona de depósito; I) foto da 2ª e 3ª camada de papel – canal e zona de detecção; J) foto da 1ª e 2ª camada de adesivo de dupla face. As camadas representadas nas imagens H, I e J são quadrados com 1,6 cm de lado.	69
Figura 5.2: Ordem das camadas de papel e adesivo para a montagem do biossensor desenvolvido para a detecção de glucose: A) ordem das camadas alternadas de papel e adesivo de dupla face; B) Esquematização do biossensor 3D para detecção de glucose já com o pó de celulose nos poços do adesivo de dupla face e reagentes depositados. As soluções de enzimas e indicadores são incolores. As cores utilizadas no esquema têm o objectivo de facilitar a interpretação; C) Foto da zona de detecção de um biossensor 3D completo por usar; D) Foto da zona de detecção de um biossensor 3D após o teste a uma solução de glucose.	70
Figura 5.3: Ordem de colocação dos indicadores no pó de celulose contido nos poços criados nas camadas de adesivo.....	71
Figura 5.4: Zonas de detecção de dispositivos utilizados no estudo de otimização do volume para a execução dos ensaios com os biossensores.	72

Figura 5.5: Comparação de zonas de depósito e detecção entre dispositivos com duas e três camadas de papel. Neste estudo o pó de celulose presente nos orifícios da camada de adesivo foi misturado com diferentes corantes alimentares.	72
Figura 5.6: Erros nas zonas de detecção de biossensores 3D usados para a detecção e quantificação de glucose em soluções de diferentes concentrações.	72
Figura 5.7: Ilustração dos resultados obtidos com os biossensores 3D de glucose. Para a concentração de 0 mM os resultados estão delimitados devido à dificuldade de identificação dos seus limites.....	73
Figura 5.8: Gráficos da análise RGB para diferentes concentrações de glucose: A) indicador AB; B) indicador KI; C) indicador ABKI. Cada ponto representa a média de quatro valores obtidos nas mesmas condições. As barras de erro representam o desvio padrão dos valores, ou seja, a sua dispersão em relação à média.	74
Figura 5.9: Comportamento dos indicadores na região de interesse biológico: A) Canal verde dos indicadores AB e ABKI; B) Canal azul dos indicadores KI e ABKI.	75
Figura 5.10: Comparação entre resultados obtidos e resultados prévios do grupo (adaptado de [40]).	76

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Composição química de alguns materiais com conteúdo de celulose (adaptado de [17]).	6
Tabela 1.2: Comparação das técnicas de padronização de zonas hidrófilas e hidrófobas utilizadas em papel para criar dispositivos de microfluídica.....	8
Tabela 3.1: Concentração relativa dos elementos presentes nos materiais estudados com a técnica de FRX.....	25
Tabela 4.1: Diferença média (d médio) entre o raio de um poço rodeado de cera impresso e difundido em função da temperatura e tempo de difusão [78].	40
Tabela 4.2: Variáveis estudadas e número total de ensaios	51
Tabela 4.3: Valores médios das massas de pó de celulose que preenchem canais cilíndricos de 2,5 e 5 mm.....	57
Tabela 4.4: Tempo de percurso da solução tamponada para canais entre camadas de papel diferentes constituídos por várias quantidades de pó de celulose.	58
Tabela 4.5: Quantidade de BSA nos poços de cada coluna da matriz.....	59
Tabela 4.6: Quantidade de proteína presente nos troços dos canais de papel segundo a calibração previamente obtida. A fonte de proteína é o próprio papel.	64
Tabela 4.7: Quantidade de proteína presente nos troços dos canais de papel segundo a calibração previamente obtida. A fonte de proteína é o pó de celulose.	65

Enquadramento e Objetivos

O diagnóstico precoce e a monitorização do estado de saúde da população são factores preponderantes para uma prevenção e tratamento mais eficazes de doenças. A deteção de uma doença numa fase inicial pode, também, reduzir drasticamente os custos associados ao seu tratamento ou acompanhamento. Assim torna-se importante a disponibilização de métodos de diagnóstico e monitorização de baixo custo e de simples execução. Estas características juntamente com a rapidez de execução, a robustez e a independência de equipamentos complexos ou dispendiosos são enfatizadas pela Organização Mundial de Saúde como objetivos a ter em conta no desenvolvimento de métodos de diagnóstico. O principal alvo deste tipo de diagnóstico são os países em vias de desenvolvimento, que não possuem infraestruturas e recursos compatíveis com métodos de diagnóstico dispendiosos.

Neste trabalho foi explorado o desenvolvimento de dispositivos de microfluídica em papel tendo em conta as características atrás mencionadas. O facto de se tratar de um tema pouco explorado e que necessita de várias abordagens no que diz respeito a áreas da ciência e engenharia faz com que se adeque ao perfil do estudante de engenharia biomédica.

O trabalho apresentado foi realizado numa constante partilha de conhecimento entre os membros do grupo de investigação cujos objetivos pessoais residiam em aplicações diferentes do mesmo tipo de tecnologia, a microfluídica em papel.

Os objetivos deste trabalho são o estudo e caracterização dos materiais envolvidos na criação de dispositivos de microfluídica no formato 3D em papel, a otimização da criação de canais de cera em papel, o estudo do comportamento de fluidos em dispositivos de microfluídica em papel, a otimização do fabrico de dispositivos de microfluídica no formato 3D em papel bem como a sua aplicação para a deteção e quantificação de glucose em soluções aquosas.

1.Introdução

1.1. Microfluídica

A microfluídica é uma tecnologia que envolve o processamento ou utilização de pequenos volumes de fluidos em canais de dimensões de dezenas a centenas de micrómetros [1]. O comportamento dos fluidos numa escala microscópica rege-se por forças diferentes da macroscópica. Para baixos volumes de fluidos a relação superfície-volume de massa do fluido aumenta, o que justifica o controlo do seu comportamento por forças relacionadas com superfícies, como a tensão superficial e a viscosidade, em detrimento de fenómenos que predominam na presença de grandes massas, como os relacionados com a inércia ou a gravidade [2], [3]. O fluxo de um fluido pode ser caracterizado pelo número de Reynolds¹. Quando as dimensões dos canais onde ocorre o fluxo são da ordem dos micrómetros, como acontece nos sistemas de microfluídica, o número de Reynolds é baixo, o que significa que os fluidos têm fluxos laminares. O fluxo laminar permite o transporte de moléculas ou partículas num modo mais estável através da movimentação regular do fluido [4].

A microfluídica deu os seus primeiros passos na análise química através de ensaios de cromatografia, onde factores como a pequena quantidade de amostras e reagentes necessários, separações e deteções com alta resolução e sensibilidade, baixo custo e resultados num curto intervalo de tempo são determinantes [1]. Estas características também foram de encontro aos interesses do exército norte-americano. Os sistemas microfluídicos foram encarados como uma solução simples e eficiente para a deteção de ameaças químicas e biológicas em ambientes hostis e com poucos recursos. O investimento do exército norte-americano direcionou o desenvolvimento de microfluídica para a redução de custos de produção de maneira a acrescentar a descartabilidade, a portabilidade e o uso sem necessidade de pessoal especializado às suas características. Outro factor importante para o estado atual da microfluídica foi o sucesso obtido nos últimos anos na área da microeletrónica [1], [3], [5]. Técnicas como a fotolitografia e materiais como silício e vidro foram importados para a microfluídica como métodos de fabrico e substratos, respetivamente. No entanto estes materiais foram posteriormente substituídos por polímeros, como o polidimetilsiloxano (PDMS), que formam a chamada microfluídica convencional, bastante aplicada nas indústrias alimentar e química [1], [6]. Estes materiais oferecem vantagens em relação a outros substratos tais como o baixo custo de produção, a precisão, a resolução e a qualidade que possibilitam na construção de canais. Contudo, os sistemas que utilizam estes polímeros como substrato requerem bombas

¹ O número de Reynolds determina o rácio entre as forças de inércia e forças viscosas quantificando a importância destas para as condições de um fluxo. Não tem dimensões e é definido por $Re = \frac{\rho v D}{\mu}$ para um fluxo num tubo, onde ρ é a densidade do fluido, v a velocidade média do fluido, D o diâmetro do tubo e μ a viscosidade dinâmica do fluido [85].

ou controles pneumáticos já que os fluidos não se movimentam por Ação capilar devido às tensões superficiais que se formam entre o fluido e o substrato que forma os canais. Esta necessidade encarece e aumenta o nível de complexidade dos sistemas e, portanto, afasta esses materiais das aplicações de microfluídica *Point-Of-Care* (POC). É neste contexto que surge o papel como alternativa a outros substratos [7]. O papel, dependendo do seu processo de fabrico, é um material hidrófilo cuja dimensão dos poros criados pela malha de fibras de celulose permite o fluxo de soluções aquosas por capilaridade. Não precisando de estímulos externos para a movimentação de fluidos, a utilização de papel aproxima os sistemas microfluídicos a aplicações do tipo POC.

As características, intrínsecas e desenvolvidas, da microfluídica têm um grande potencial para aplicações biomédicas [1]. Os sistemas de microfluídica já são integrados com sensores de leitura de resultados e módulos de pré preparação das amostras a analisar (*Lab-on-chip*). Assim, estes sistemas apresentam vantagens para a sua aplicação no desenvolvimento de testes POC eliminando a necessidade de métodos convencionais utilizados em laboratórios de países desenvolvidos. Os sistemas têm de ser baratos, precisos, fiáveis e robustos de maneira a serem utilizados em contextos médicos e sociais, próprios de países em vias de desenvolvimento [7], [8].

A Figura 1.1 mostra um dispositivo de microfluídica convencional.

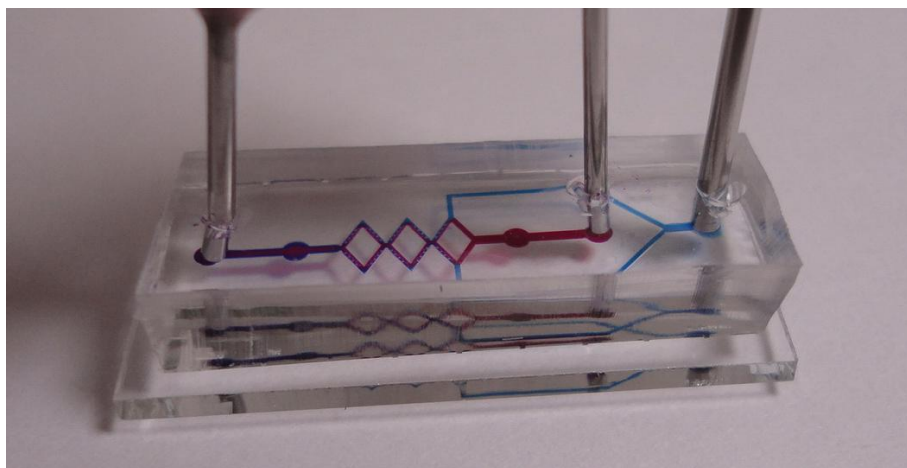


Figura 1.1: Dispositivo de microfluídica construído em PDMS e vidro. Os canais têm 200 μm de largura e 130 μm de altura com um offset de 30 μm . As obstruções em forma de diamante têm 100 μm de altura e largura. Imagem gentilmente cedida por *Iwona Bernacka-Wojcik*, investigadora no CENIMAT.

1.2. Microfluídica em papel

O papel tem sido estudado como substrato de sistemas de microfluídica para aplicações como diagnóstico clínico, monitorização ambiental e verificação de qualidade alimentar. As razões que fazem do uso de papel uma vantagem enquanto substrato para microfluídica são: 1) é um material comum em todo o mundo; 2) é extremamente barato; 3) dependendo de alguns factores de fabricação, é hidrófilo e poroso, o que permite a movimentação de fluidos aquosos por capilaridade sem necessidade de forças externas; 4) é compatível com o uso em aplicações químicas e biomédicas; 5) é um material biodegradável. Estas vantagens fazem um sistema de microfluídica baseado em papel barato, fácil de usar, descartável e independente do uso de equipamento externo, características fundamentais para aplicações POC, principalmente em países ou zonas com poucos recursos [4], [9], [10]. As desvantagens do uso de papel em sistemas de microfluídica prendem-se com a complexidade do estudo do fluxo de uma solução em canais completamente aleatórios formados pela disposição de fibras de celulose que compõem a estrutura do papel, que dificulta também a própria padronização de canais, e com a influência que a humidade e a temperatura têm na condução de fluidos no papel [11], [12]. O movimento de uma solução aquosa na rede celulósica do papel é estudada através da equação de Washburn [13]:

$$d(t) = \sqrt{\frac{\gamma D t}{4\eta}} \quad \text{Eq. 1.1}$$

onde $d(t)$ é a distância percorrida por um líquido, com viscosidade η e tensão superficial γ , num material poroso com um diâmetro médio de poro D durante um intervalo de tempo t . Contudo esta equação pressupõe a movimentação de uma solução num sistema de tubos capilares cilíndricos com diâmetro regular, o que não corresponde à estrutura presente no papel [12].

1.2.1. Papel

O papel é um material conhecido em todo o mundo sendo utilizado maioritariamente para escrita, impressão e embalagens. Trata-se de um material fino e flexível, composto por uma rede de fibras de celulose resultante da drenagem de uma pasta aquosa de celulose proveniente de plantas. A fabricação de papel, segundo a definição anterior, foi iniciada na China há mais de dois mil anos [14]. O papel tem várias aplicações para além das já referidas sendo utilizado para filtração, limpeza, como isolante, dispositivos médicos e até mesmo na construção de transístores, entre outros [15].

1.2.1.1. Composição do papel

A composição do papel depende não só da origem das fibras que constituem a sua rede como dos processos mecânicos e/ou químicos envolvidos na sua fabricação. As fibras que formam o papel são constituintes das paredes das células vegetais. As paredes das células vegetais são formadas maioritariamente por celulose, hemicelulose e lenhina, contendo ainda uma pequena porção de extratos orgânicos e inorgânicos. A celulose, componente principal do papel, tem funções estruturais nas células vegetais. No seu estado natural apresenta-se como um polissacarídeo linear e homogêneo que tem β -1,4-D-glucopirranose como monómero. A celulose natural apresenta um grau de polimerização médio entre 3000 e 15000 dependendo da sua origem. É um material semicristalino com um índice de cristalinidade que varia entre 50 e 90% dependendo da sua origem. A propriedade que faz da celulose o material mais usado para o fabrico de papel é a capacidade das suas fibras se ligarem fortemente quando secas a partir de uma pasta aquosa. Essas ligações entre fibras de celulose são feitas através de pontes de hidrogénio nos grupos hidróxilo do seu monómero [14], [16].

A hemicelulose é formada por um conjunto de diversos polissacarídeos de baixo peso molecular. A sua função nas células vegetais não é totalmente compreendida mas suspeita-se ter um papel ativo no transporte de água. A presença de hemicelulose na estrutura do papel está, geralmente, correlacionada positivamente com a resistência à tração. Há evidências que a hemicelulose contribui para as ligações entre fibras do papel [14].

A lenhina é um polímero aromático de estrutura complexa e amorfa. A sua função nas células vegetais é de fortalecimento da estrutura da madeira e resistência à ação de microrganismos. A presença de lenhina no papel apresenta várias desvantagens como o enfraquecimento da sua estrutura e a aceleração da oxidação por processos fotoquímicos que tornam o papel amarelo e descolorado [14]. A Figura 1.2 mostra as estruturas químicas da celulose, hemicelulose e lenhina.

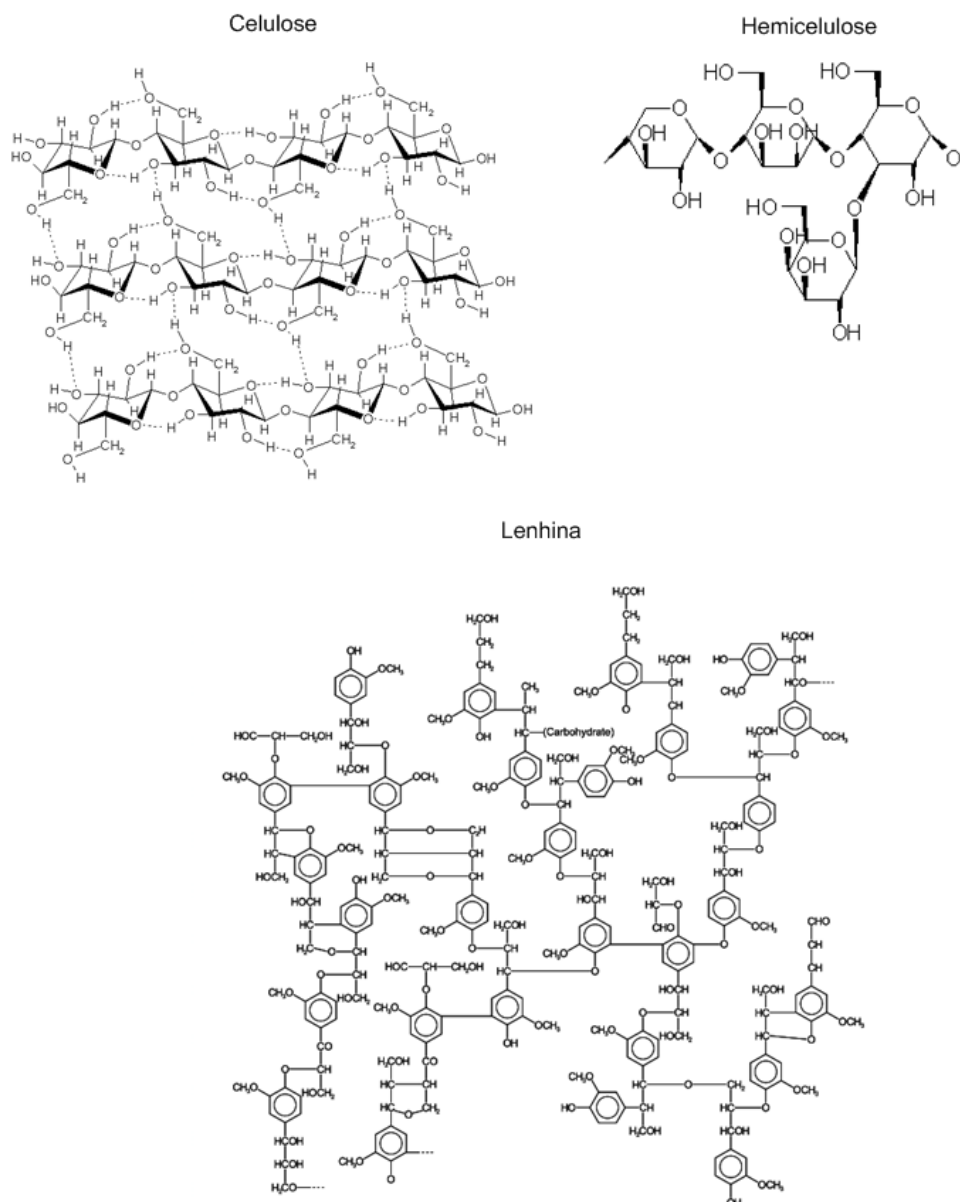


Figura 1.2: Estrutura química dos compostos presentes nas paredes das células vegetais (adaptado de [17–19]).

A concentração destas substâncias varia consoante o tipo de planta. A maior parte do papel produzido tem origem em plantas lenhosas que se dividem em plantas de madeira macia e madeira dura. As fibras provenientes de madeira macia são mais longas e resistentes do que as fibras de madeira dura, conferindo assim propriedades diferentes ao papel que é fabricado. Também pode ser produzido papel a partir de plantas não lenhosas ou mesmo de fibras recicladas [14].

A Tabela 1.1 indica a distribuição dos principais componentes em algumas das plantas mais utilizadas para a produção de papel.

Tabela 1.1: Composição química de alguns materiais com conteúdo de celulose (adaptado de [16]).

Fonte	Composição (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lenhina	Extratos
Madeira Macia	40-44	25-29	25-31	1-5
Madeira dura	43-47	25-35	16-24	2-8
Cana-de-açúcar	40	30	20	10
Algodão	95	2	1	0.4
Juta	71	14	13	2
Cânhamo	70	22	6	2
Linho	63	12	3	13

O papel pode ser formado através de pastas mais ou menos modificadas. A qualidade e propriedades do papel produzido é dependente da concentração de cada constituinte das células vegetais na pasta que formará o papel. Para papel com maior qualidade é necessário aumentar o grau de modificação da pasta que contém, entre outros, celulose. Processos químicos na fabricação de papel permitem a remoção de lenhina e outros compostos das fibras de celulose que vão formar o papel. Existem também tratamentos que alteram propriedades do papel, como o brilho ou o branqueamento. Todos estes processos interferem na composição química do papel, justificando a presença de resinas, minerais e outras substâncias na rede de papel [14].

1.2.1.2. Fabricação do papel

O fabrico de papel começa com a trituração de madeira, no caso de a matéria ter origem em plantas lenhosas. A este processo pode-se seguir a polpação química, onde a matéria danificada mecanicamente é submetida a um banho ácido (*sulfite pulping*) ou básico (*kraft pulping*) num ambiente de altas temperaturas e pressões que decompõem a lenhina presente na madeira ou células vegetais. A polpação química afeta não só a lenhina mas também as fibras de celulose reduzindo o seu peso molecular e solubilizando os hidratos de carbono. A pasta resultante destes processos apresenta-se com uma cor acastanhada devido à presença residual de lenhina. É efetuado um passo de lavagem para a remoção de lenhina da pasta bem como dos compostos químicos do processo de polpação química. Os processos seguintes são os de dispersão e refinação da pasta. O processo de dispersão tem como objetivo espalhar as fibras da pasta de forma homogénea em solução aquosa. A refinação envolve a movimentação

forçada da suspensão de fibras por uma estrutura que força a disposição das fibras num certo plano. As forças mecânicas e hidráulicas envolvidas neste processo alteram as características das fibras. A água da pasta é drenada durante a sua passagem numa plataforma rolante. Neste processo as fibras ligam-se e formam uma rede que é pressionada por rolos mecânicos. Depois de uma fase de secagem é obtida a folha de papel. Dependendo da aplicação do papel pode haver adição de substâncias à pasta de fibras bem como tratamentos superficiais com o objetivo de melhorar determinadas características do papel [14], [20].

1.2.2. Fabricação de dispositivos de microfluídica em papel

Apesar da iniciativa do desenvolvimento de dispositivos de microfluídica em papel ser atribuída ao grupo de Whitesides da Universidade de Harvard, os primeiros sistemas foram criados por Muller em 1949, ilustrados na Figura 1.3 [9].

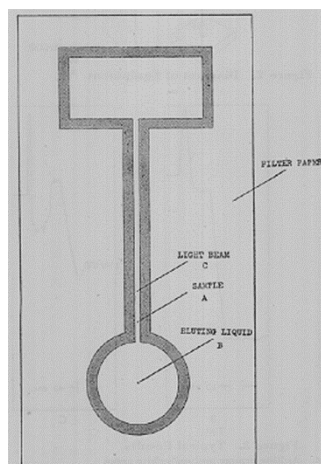


Figura 1.3: Canal de microfluídica em papel de filtro criado através do método de impregnação de parafina desenvolvido por Müller *et al.* em 1949 [21].

A fabricação destes dispositivos consiste na padronização de canais hidrófilos através da criação de barreiras hidrófobas, ou na criação de canais hidrófilos num meio hidrófobo [11]. O papel utilizado para estes dispositivos é hidrófilo, portanto os canais são formados pela conjugação deste substrato com materiais e/ou técnicas que produzam uma interface hidrófoba ou que confinam o fluxo de uma solução numa determinada região.

A Tabela 1.2 indica diferentes técnicas para a fabricação de dispositivos de microfluídica em papel. Estas técnicas podem ser divididas em três grandes categorias: bloqueio físico dos poros do papel, deposição localizada de um reagente hidrófobo e modificação química da superfície das fibras de celulose [9].

Tabela 1.2: Comparação das técnicas de padronização de zonas hidrófilas e hidrófobas utilizadas em papel para criar dispositivos de microfluídica.

Técnica de fabricação	Agente ativo	Princípio de padronização	Abordagem de padronização
Impressão a cera [22–26]	Cera	Deposição física de reagente na superfície das fibras	Criação de zonas hidrófobas
Impressão flexográfica [27]	Poliestireno	Deposição física de reagente na superfície das fibras	Criação de zonas hidrófobas
Gravação a jacto de tinta [28],[29]	Poliestireno	Deposição física de reagente na superfície das fibras	Tornar hidrófilo depois de hidrófobo
Tratamento por plasma [30]	Alkyl ketene dimer (AKD)	Modificação química da superfície das fibras	Tornar hidrófilo depois de hidrófobo
Impressão a jacto de tinta [31],[32]	AKD	Modificação química da superfície das fibras	Criação de zonas hidrófobas
Fotolitografia [33],[34]	Fotoresiste (exemplo: SU-8)	Bloqueio físico dos poros do papel	Tornar hidrófilo depois de hidrófobo
Corte [35],[36]	-	Bloqueio físico dos poros do papel	Limitar zona hidrófila
Serigrafia [37]	Cera	Bloqueio físico dos poros do papel	Criação de zonas hidrófobas
Tratamento por laser [38]	Depende do tipo de papel	Bloqueio físico dos poros do papel	Tornar hidrófilo depois de hidrófobo
Deposição [39]	PDMS	Bloqueio físico dos poros do papel	Criação de zonas hidrófobas

Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, sendo que a escolha de cada uma deve ser justificada com os objetivos que se pretendem para a fabricação de um dispositivo de microfluídica em papel bem como da acessibilidade do material ou método necessário. Ainda assim, a fabricação de dispositivos através da impressão a cera mostra-se como uma das técnicas mais promissoras. Apresenta vantagens como custo reduzido do agente de padronização, processo de fabricação simples, fácil e rápido. Estas características fazem da impressão a cera um processo com potencial para fabrico em grande escala. Para padronizar canais em papel com esta técnica é necessário: 1) desenhar o percurso pretendido; 2) imprimir o percurso no papel através de uma impressora ink-jet de cera; 3) sujeitar o papel impresso a uma temperatura suficiente para derreter a cera, de maneira a que esta se difunda no papel e crie barreiras intransponíveis por soluções aquosas. Este método não apresenta os melhores resultados quanto à resolução dos canais criados, no entanto permite construir canais funcionais menores que um milímetro que são eficientes para várias aplicações de microfluídica [11]. A cera utilizada, da marca Xerox, é um material composto essencialmente por parafina contendo pelo menos um tipo de terpeno e poliamida [40], [41]. Existem vários grupos que já utilizaram

este material e técnica para padronizar papel com o objetivo de construir dispositivos de microfluídica [24–26], [42].

A Figura 1.4 mostra os blocos de tinta sólida da marca Xerox, utilizados neste trabalho.



Figura 1.4: Blocos de tinta sólida (cera) da marca Xerox.

1.2.2.1. Dispositivos de formato 3D

Os dispositivos de microfluídica em papel permitem o fluxo lateral de soluções, caso sejam construídos em apenas uma camada de papel. Apesar da simplicidade de construção, estes dispositivos apresentam algumas limitações no desenho de percursos para soluções a analisar [34]. Whitesides et al. apresentou pela primeira vez, em 2008, o formato 3D para dispositivos de microfluídica em papel. Estes consistem na sobreposição de camadas de papel padronizadas que possibilitam o fluxo intercamadas, além do fluxo lateral. A possibilidade do fluxo intercamadas, ou fluxo vertical, acrescenta liberdade à formação de percursos que pode ser aproveitada para a construção de uma rede de canais mais complexa. Assim, o formato 3D apresenta várias vantagens em relação aos dispositivos de fluxo lateral como: 1) a capacidade de obter um maior número de ensaios numa área menor; 2) uma distribuição de amostra mais rápida (o fluxo vertical é consideravelmente mais rápido que o lateral tendo em conta a espessura do papel); 3) a possibilidade de realizar múltiplos ensaios em paralelo para um baixo volume de amostra; 4) cada camada do dispositivo pode ser de um tipo de papel indicado para uma função específica [11], [42].

Os dispositivos de microfluídica em papel com formato 3D podem ser construídos com o recurso a camadas de adesivo que permitam o contacto das camadas de papel em pontos específicos, através da técnica origami, que permite a sobreposição de zonas padronizadas através de dobras sucessivas de uma única folha de papel, e ainda com o recurso a adesivo de spray que é depositado nas camadas de papel para as unir [34], [42], [43]. O tipo de fabrico de canais

hidrófobos nas camadas de papel não é relevante para a construção de um dispositivo 3D desde que permita a sua sobreposição.

A Figura 1.5 mostra um dispositivo de microfluídica com formato 3D. O formato 3D para dispositivos de microfluídica em papel já foi aplicado a biossensores com o objetivo de detetar glucose e proteínas como albumina de soro bovino (BSA), alfa feto proteína (AFP), antígeno carboidrato 125 (CA125) e 199 (CA199), antígeno carcinogénico embrionário (CEA), alanina transaminase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) [11], [34], [42], [44], [45].

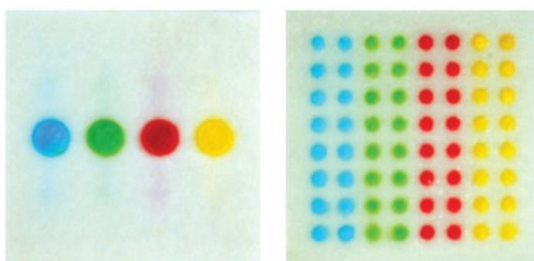


Figura 1.5: Dispositivo de microfluídica em papel com formato 3D. A primeira camada do dispositivo contém quatro zonas de depósito de amostra. À direita da figura está a última camada do dispositivo, que possui sessenta e quatro zonas de teste. Este dispositivo tem 2 cm de lado (adaptado de [34]).

1.3. Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico que consiste num bioreceptor, um sistema de reconhecimento de uma substância biológica, e um transdutor, um sistema de transformação de atividade num sinal mensurável. Os biossensores são utilizados fundamentalmente para a monitorização de saúde e ambiente. A capacidade de detetar indicadores de patologias ou estados fisiológicos relevantes com grande sensibilidade e especificidade permite um diagnóstico numa fase inicial de uma condição, que pode reduzir de maneira relevante o custo associado ao tratamento do paciente [46], [47].

A humanidade sempre realizou bioanálises utilizando as suas capacidades sensoriais como células nervosas do nariz ou reações enzimáticas na língua. Com o desenvolvimento do conhecimento do meio que nos rodeia, vários sistemas de deteção bioquímica presentes na natureza começaram a ser adaptados e controlados para efeitos de análise. Esta evolução na utilização de elementos de biorechecimento, combinados com métodos de transdução, permitiram a criação e expansão dos biossensores que podem ser classificados de acordo com o seu tipo de bioreceptor ou transdutor. Os bioreceptores mais utilizados baseiam-se nas interações de: 1) anticorpo/antígeno; 2) ácidos nucleicos; 3) enzimas; 4) células; 5) materiais biomiméticos. No caso dos transdutores, as técnicas mais utilizadas são: 1) medidas óticas; 2) medidas eletroquímicas; 3) medidas sensíveis a massa e 4) deteção térmica [48]. Os biossensores modernos baseiam-se em técnicas de micro ou nano escala que melhoram os

seus métodos de detecção e podem torná-los mais rápidos, baratos, fáceis de usar bem como aumentar a sua portabilidade. Estas vantagens aproximam os biossensores de testes de diagnóstico POC [47].

1.3.1. Biossensores em papel

A utilização de papel em biossensores para diagnóstico ou monitorização de saúde permite a aproximação às características indicadas pela Organização Mundial de Saúde como ótimas para utilização destes dispositivos em zonas do globo desfavorecidas, seguindo as indicações ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered to those in need*).

Os biossensores de papel podem ser divididos em três categorias: testes em tira (dipstick), testes de fluxo lateral (LFA) e dispositivos de análise de microfluídica de papel (μ PAD) [49]. Os testes de *dipstick* são os mais simples já que são baseados no depósito da amostra numa tira de papel com reagentes pré-depositados. O melhor exemplo deste tipo de biossensor é o teste de medição de pH em soluções.

Os testes LFA são dispositivos que também têm os reagentes armazenados mas a amostra depositada move-se através de um fluxo lateral num percurso pré definido na membrana de papel. Os LFA apresentam maior flexibilidade em relação aos testes dipstick pois promovem o contacto de uma mesma amostra com reagentes diferentes, em instantes diferentes. Podem ser utilizados vários formatos como o de sanduíche, o competitivo ou o de multidetecção. Usualmente os LFA são constituídos por quatro zonas diferentes: a zona de depósito da amostra, a zona de conjugação, a zona de detecção e a zona de absorção. Estas zonas podem ser constituídas por diversos materiais ou por um só funcionalizado por zonas. As principais desvantagens deste formato de biossensor é a impossibilidade de obter uma análise múltipla e quantitativa [49].

Os μ PAD resolvem esses problemas. Estes dispositivos integram as vantagens do papel, enquanto material, com as da microfluídica, enquanto tecnologia. Requerem um baixo volume de amostra para obter análises múltiplas e quantitativas.

Os dispositivos μ PAD podem utilizar vários tipos de detecção, entre as quais: 1) ótica simples; 2) através de leitores de microplacas; 3) quimiluminescente, 4) eletroquímica e 5) piezoresistiva. Alguns destes métodos precisam de equipamento externo complexo para leitura de resultados, o que impossibilita os objetivos pretendidos. Contudo, para detecção ótica, foi sugerida a utilização de uma câmara digital, ou mesmo uma câmara integrada num *smartphone*, de maneira a obter os resultados das análises dos biossensores [25], [49], [50].

Há registos da aplicação de μ PAD a diagnóstico de saúde [28], [29], [39], [51], análise bioquímica [31], monitorização ambiental [52], controlo de qualidade alimentar [53], análise biomédica [32] e ciência forense [38]. A Figura 1.6 mostra um biossensor do tipo μ PAD.

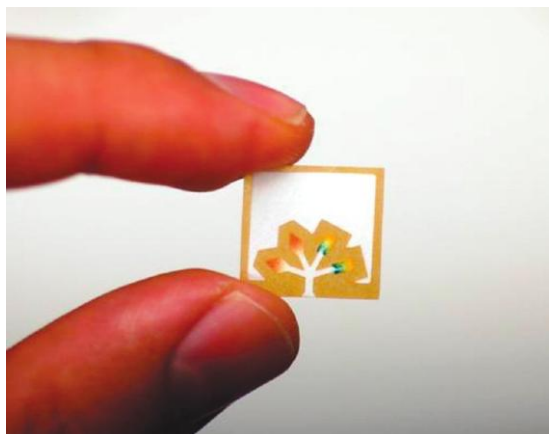


Figura 1.6: Biossensor μ PAD de papel sensível a glucose e proteína (BSA) [11].

1.3.2. Glucose

A glucose é a fonte de energia primária das células do organismo humano [54]. É transportada dos intestinos, ou fígado, até às células através da corrente sanguínea. A absorção da glucose pelas células é possível devido à ação da insulina, uma proteína hormonal. O nível normal de glucose no sangue humano é de cerca de 5,5 mM. Este nível pode variar durante o dia, baixando antes das refeições e atingindo picos depois destas. Níveis de glucose abaixo de 4 mM e acima de 5,5 mM em jejum indicam estados de hipoglicémia e hiperglicemia, respetivamente. Durante o dia a concentração de glucose, para não diabéticos, não deve ultrapassar os 7 mM. Estados prolongados de níveis de glucose no sangue fora do intervalo saudável podem indicar estados de condição médica. Uma das doenças mais relevantes que está relacionada com níveis anormais de glucose no sangue é a diabetes. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 347 milhões de pessoas no mundo sofrem de diabetes. A diabetes provoca várias consequências no organismo como aumento de probabilidade de enfarte ou lesões nervosas [55].

Foi escolhida a determinação da concentração de glucose como aplicação de biossensores 3D devido às concentrações com interesse biológico desta substância serem elevadas e à facilidade de comparação com resultados efetuados em biossensores de papel de outros formatos.

Para a quantificação de glucose utilizou-se um processo enzimático. A ação de glucose oxidase sobre a glucose gera peróxido de hidrogénio como produto que, por sua vez, é submetido à ação da peroxidase que, na presença de indicadores sensíveis a este composto, provoca uma reação colorimétrica proporcional à concentração de glucose que desencadeia o processo [26], [50], [51]. A Figura 1.7 mostra as reações presentes no biossensor 3D construído.

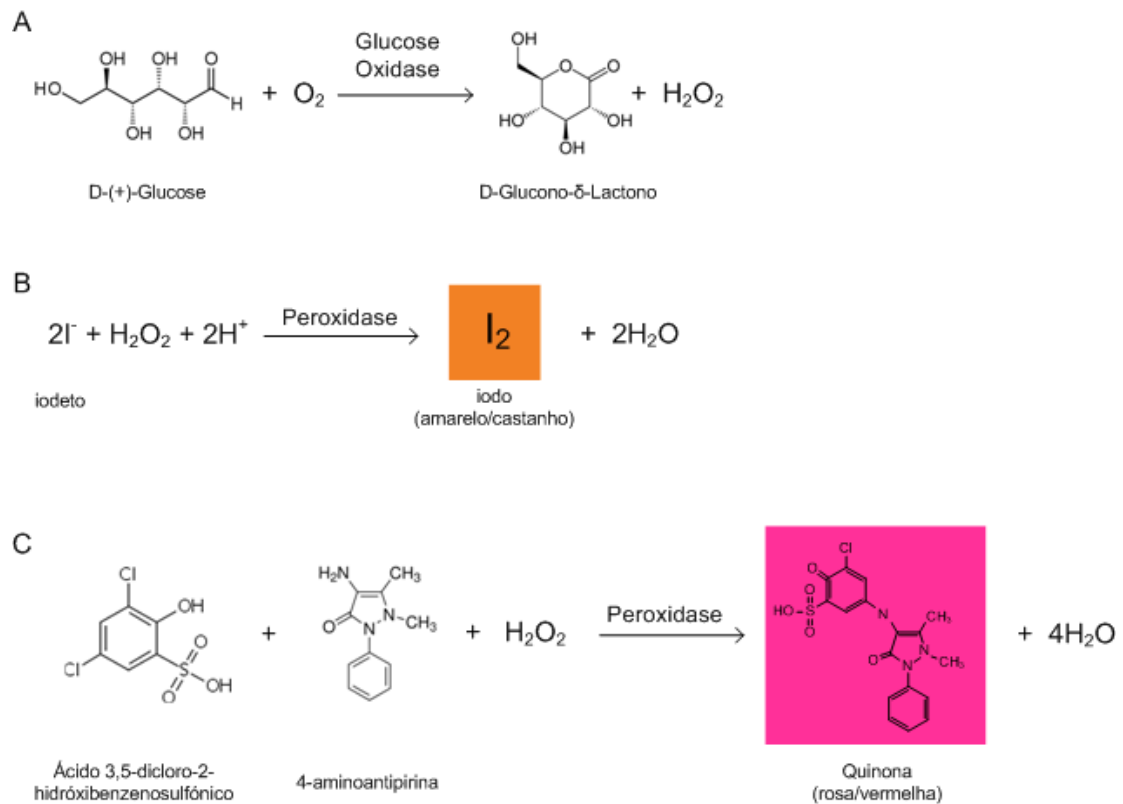


Figura 1.7: Reações enzimáticas utilizadas para quantificar a concentração de glucose presente numa solução biológica.

2. Técnicas de caracterização

2.1. Fluorescência de raios-X

A Fluorescência de Raios-X (FRX) é uma técnica que permite uma análise elementar qualitativa e quantitativa de amostras. Esta técnica detecta os raios-X emitidos pelos elementos após serem ionizados. Os raios-X emitidos por um átomo ionizado têm energias características, sendo a sua intensidade proporcional à concentração do elemento na amostra. Num átomo estável, os elétrons estão posicionados em orbitais de diferentes energias. Quando o feixe incidente na amostra tem energia igual ou superior às energias das orbitais é ejetado um elétron. A lacuna criada numa orbital interior vai ser ocupada por outro elétron de uma camada menos energética – decaimento eletrónico. A diferença energética dos níveis de transição do elétron equivale à energia do fóton de raio-X emitido.

Nem todas as ionizações resultam em emissão de raios-X. A razão entre o número de raios-X emitidos e o total das ionizações é chamada rendimento de fluorescência. Este aumenta com o número atômico dos elementos a analisar. Para elementos com números atômicos inferiores a $Z=11$ o rendimento de fluorescência não é suficiente para o funcionamento da técnica.

A técnica de FRX permite a deteção de elementos com baixa concentração na amostra a analisar, já que apresenta uma sensibilidade na ordem de partes por milhão (ppm). Trata-se de uma técnica não destrutiva, rápida e de baixo custo [56], [57].

Neste trabalho foi usado o equipamento PANalytical XRF WDS 4kW AXIOS, representado na Figura 2.1.



Figura 2.1: Equipamento FRX utilizado neste trabalho: PANalytical XRF WDS 4kW AXIOS

2.2. Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier

A técnica de FTIR (do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy) é uma das principais técnicas de caracterização química. Permite a identificação de moléculas em compostos no estado sólido, líquido ou gasoso. A técnica baseia-se na absorção de radiação infravermelha pelas moléculas, sendo necessário que estas apresentem alterações no seu momento dipolar elétrico. Os espectros FTIR são obtidos pela determinação da fração do feixe incidente que é absorvida pela amostra, sendo característicos para cada composto. A absorção da radiação ocorre apenas em determinadas regiões do espectro, que dependem de factores como o tipo de ligações presentes, átomos envolvidos e o próprio modo de vibração. De um modo geral, os modos de vibração podem ser divididos em dois grandes tipos: estiramento (*stretching*), que envolve mudanças na distância de ligação interatômica, e encurvamento (*bending*), que envolve mudanças no ângulo da ligação ou na posição relativa dos átomos na molécula.

O espectro de FTIR pode ser apresentado no modo de transmissão, evidenciando a irradiação que atravessa a amostra ou no modo de absorção, demonstrando a irradiação absorvida pela amostra. Efetuando um varrimento em frequência da radiação eletromagnética, obtém-se um espectro de transmissão, ou absorção, que evidencia as zonas de absorção dos grupos funcionais na forma de picos ascendentes, ou invertidos, respetivamente.

Para amostras opacas usam-se técnicas de refletância. Uma dessas técnicas é a refletância total atenuada (ATR). Este tipo de espectroscopia utiliza o fenómeno de reflexão total interna do cristal contido no módulo de ATR para obter informação sobre o material em estudo. O cristal do módulo está em contacto com a amostra a analisar. A radiação infravermelha incide no cristal que o reflete internamente. O feixe ultrapassa a interface entre o cristal e o material em estudo, e quando o material absorve radiação o feixe perde energia para o comprimento de onda absorvido [58], [59].

A Figura 2.2 mostra o equipamento FTIR usado, montado com o módulo de ATR.



Figura 2.2: Equipamento FTIR Nicolet 6700 FT-IR DA THERMO ELECTRON CORPORATION com módulo ATR SMART iTR com cristal de diamante da Thermo Scientific.

2.3. Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) é uma técnica utilizada para se obter informação estrutural de materiais, permitindo a identificação de fases cristalinas ou amorfas. A execução da técnica começa pela incidência de um feixe eletromagnético de raios-X com comprimento de onda bem definido num material. Para se entender a interação entre a radiação incidente de raios-X e a estrutura de um material é necessário ter em conta a contribuição para a dispersão da radiação incidente por parte de todos os elétrons dos átomos que formam um material. Da mesma maneira, tem de se ter em conta todas as contribuições dos átomos que pertencem a uma célula constituinte da rede cristalina para a dispersão da radiação. Por último, a soma das interferências destas células para a dispersão da radiação é o indicador da estrutura do material que formam. No caso de existir um padrão de células periódicas que formem planos na estrutura do material a dispersão da radiação, que estas originam, produz uma interferência construtiva, ou seja, um fenómeno de difração. Este fenómeno só é possível para um comprimento de onda do feixe incidente na ordem de grandeza da distância entre planos da estrutura cristalina. Neste caso é possível calcular essa distância através da Lei de Bragg:

$$n_i \times \lambda = 2d \times \sin\theta \quad \text{Eq. 2.1}$$

onde θ é o ângulo de Bragg, λ o comprimento de onda do feixe incidente, d a distância entre planos cristalinos e n_i o número de reflexão. O esquema da Figura 2.3 mostra as relações entre as variáveis.

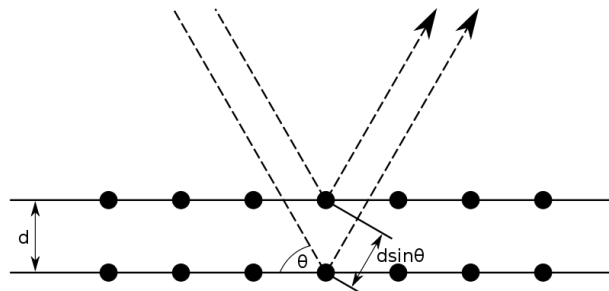


Figura 2.3: Esquema de difração do feixe incidente pelos planos cristalográficos do material [60].

Ao variar o ângulo de incidência do feixe no material é possível, através de um detetor, medir a intensidade do feixe difratado, obtendo assim um difratograma. Os picos desse difratograma correspondem a interferências construtivas provocadas pelo arranjo planar de distância constante por parte do material [58], [61].

O aparelho utilizado foi um X'Pert Pro da PANalytical, representado na Figura 2.4.



Figura 2.4: Equipamento de DRX utilizado neste trabalho: X'Pert PANalytical.

2.4. Ângulo de contacto

O critério mais usado para estudar a interface criada por um sólido e um líquido é o ângulo de contacto. Este ângulo forma-se com a intersecção de três fases diferentes: sólida, líquida e gasosa. O ângulo é medido, por convenção, no interior da fase líquida. Este ângulo é o resultado das diferentes tensões superficiais que o sistema trifásico suporta de maneira a garantir a sua estabilidade. Existe, então, uma relação entre o ângulo de contacto e a tensão de superfície criada pela intersecção dos diferentes meios. Essa relação está implícita na equação de Young [3]:

$$\cos \theta_c = \frac{\gamma_{GS} - \gamma_{LS}}{\gamma_{GL}} \quad \text{Eq. 2.2}$$

Onde γ_{GS} é a tensão superficial entre o sólido e o gás, γ_{LS} a tensão entre o líquido e o gás e γ_{GL} a tensão superficial entre o gás e o líquido, sendo θ_c o ângulo que o líquido forma com o sólido resultante destas tensões entre fases. A Figura 2.5 mostra a relação entre as grandezas da equação 2.2.

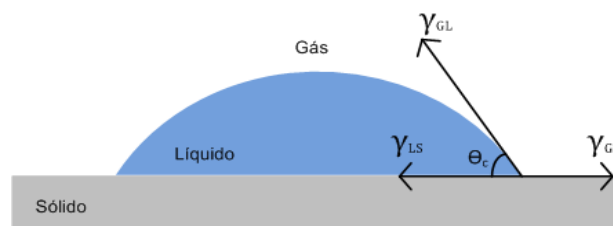


Figura 2.5: Relação entre o ângulo de contacto e as diferentes tensões superficiais das interfaces do sistema.

A relação entre as interfaces foi estudada através do método Sessile Drop. Este método consiste na observação, em perfil, do comportamento das interfaces criadas aquando da deposição de uma gotícula num substrato sólido no plano horizontal. Foi nestas condições que se obtiveram os ângulos de contacto dos sistemas estudados neste trabalho.

O conhecimento do ângulo de contacto num sistema permite prever se uma gota de um líquido irá restringir-se a uma pequena área de contacto com um sólido ou, espalhar-se pela superfície deste, dependendo da tensão superficial entre os intervenientes. No caso da água, este comportamento define a hidrofília ou hidrofobia do sólido, dependendo se o ângulo de contacto formado pelo sistema é menor ou maior que 90° , respetivamente [62], [63].

Neste trabalho, a técnica em questão é utilizada para estudar a relação dos materiais constituintes dos biossensores 3D em estudo com água. Os ângulos de contacto dos sistemas analisados foram obtidos através de um equipamento OCA 20 da marca Data Physics, representado na Figura 2.6.

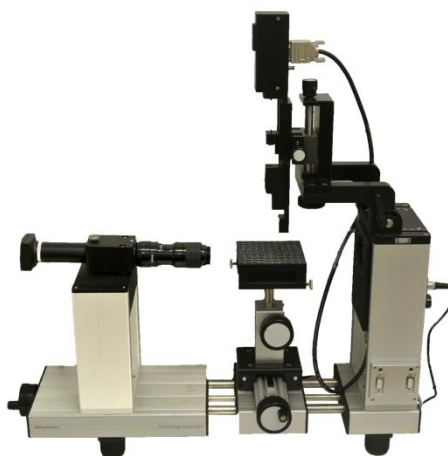


Figura 2.6: Equipamento OCA 20 da marca Data Physics utilizado para determinar os ângulos de contacto dos sistemas analisados.

2.5. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia de varrimento por eletrões permite a caracterização morfológica dos materiais. Usa um feixe de eletrões primários que incide na amostra. Estes, ao interagirem com os elementos da amostra, podem ser absorvidos, emitidos, refletidos ou transmitidos. Como resposta a amostra pode emitir eletrões, luz ou raios-X. Os eletrões emitidos pela amostra após a incidência de um feixe de eletrões primários podem ser secundários, de Auger ou retrodifundidos. A emissão de eletrões secundários resulta da excitação dos elementos a que

pertencem, devido à incidência do feixe de elétrons primários com energias até 50 keV. É a detecção dos elétrons secundários que possibilita a formação da imagem convencional do SEM. A detecção de elétrons retrodifundidos também contribui de forma relevante para a obtenção de imagem. A informação que vai originar a imagem resulta do varrimento de uma zona da amostra pelo feixe de elétrons. Os elétrons secundários serão emitidos em direções dependentes do ângulo de incidência do feixe de emissão com a superfície da amostra. A detecção destes possibilita obter uma análise topográfica da superfície da amostra. Algo que se traduz numa percepção de profundidade da superfície da amostra. A imagem será formada por mapeamento, que transforma a informação do espaço da espécie recolhida pelo detetor em espaço do CRT (tubo de raios catódicos). Os pontos da imagem de maior brilho correspondem a pontos mais altos da superfície da amostra. Esta diferença de brilhos deve-se às diferentes distâncias percorridas pelos elétrons secundários, que partem dos elementos da amostra e chegam ao detetor do SEM com energias diferentes.

O uso da obtenção de imagem por detecção de elétrons apresenta vantagens sobre a microscopia ótica tais como maior capacidade de ampliação, maior profundidade de campo e maior resolução.

É possível obter ampliações de dez a quinhentas mil vezes. Este poder de ampliação permite ao observador visualizar superfícies com tamanhos na ordem dos nanómetros.

Pode ser necessário cobrir as amostras com camadas de substâncias condutoras para ser possível obter uma imagem. A deposição destas camadas reduz um possível efeito de carga à superfície da amostra a analisar. São exemplos destes materiais o carbono e o ouro. Outra solução pode ser a redução energética do feixe incidente ao nível em que o número de elétrons primários é da ordem de grandeza do número de elétrons secundários e de retrodifusão [56], [64]. A Figura 2.7 mostra o equipamento utilizado neste trabalho.



Figura 2.7: Equipamento de SEM CARL ZEISS AURIGA CROSSBEAM SEM-FIB utilizado neste trabalho.

2.5.1. Espectroscopia dispersiva de raios-X

A Espectroscopia por dispersão energética de raios-X (EDS) é uma técnica de caracterização química. O detetor de EDS utilizado encontra-se acoplado ao equipamento SEM. A amostra a analisar é excitada por um feixe de elétrons primários (o feixe de SEM). O tipo de resposta dos elementos do alvo que o EDS procura é a emissão de raios-X. Os raios-X emitidos por os elementos do alvo passam por uma janela até atingirem o detetor. Neste, os fótons são absorvidos e provocam o efeito fotoelétrico no material do detetor. Os elétrons que são ejetados pelo detetor são amplificados e o seu sinal é convertido em voltagem que depende da energia de cada fóton incidente no detetor. Este sinal é analisado por um CXA (analisador computadorizado de raios-X) e a informação é apresentada como um espectro ou um mapeamento de intensidade por voltagem. Estas voltagens correspondem às emissões de raios-X com energias específicas para cada elemento, sendo assim possível distinguir a sua presença na amostra. A intensidade destes valores (contagens para cada voltagem) indica a quantidade de um elemento presente na amostra [56]. O equipamento utilizado permite a identificação de elementos com número atômico superior a $Z=4$. O limite de detecção é na ordem dos 200 ppm para elementos com picos bem definidos. A resolução energética é uma das desvantagens desta técnica, o que provoca sobreposição de picos característicos [58], [65].

3. Caracterização dos materiais

3.1. Materiais hidrófilos

O papel de cromatografia Whatman nº1 (Whatman Internacional Ltd., Florham Park, NJ, USA) apresenta propriedades que permitem o fluxo de soluções por capilaridade. Está demonstrado que é possível construir, neste substrato, canais de cera com resolução compatível com ensaios de microfluídica [23], [26], [40], [66].

O pó de celulose (Merck, Darmstadt, Germany) foi apresentado como uma solução para a ligação de camadas de papel, possibilitando assim a construção de um dispositivo do tipo μ PAD [11], [34], [42].

Estes materiais formam as zonas hidrófilas dos dispositivos em estudo. A sua caracterização e comparação são fundamentais para a compreensão dos canais hidrófilos que conduzem as soluções a analisar.

3.1.1. Espectroscopia dispersiva de raios-X

A realização da técnica de EDS permitiu uma análise elementar dos materiais em estudo. O ensaio fez-se recorrendo ao equipamento de SEM, utilizado neste trabalho. As amostras foram cobertas por uma liga de ouro e paládio. Foi utilizada uma tensão de aceleração de 15 kV e uma abertura de diafragma de 60 μ m.

A Figura 3.1A representa a zona de papel de cromatografia Whatman nº1 analisada. O espectro de EDS obtido, Figura 3.1B, contém vários picos. O pico situado em $E = 0$ keV é característico do equipamento e, portanto, não fornece informação relativamente ao estudo do material. Os picos situados entre as energias de 1,5 keV e 4 keV devem-se ao ouro e paládio, usados como cobertura do material analisado. Assim, os picos que apresentam informação sobre o papel Whatman nº1 são os de energia 0,277 keV e 0,525 keV, que correspondem à presença de carbono e oxigénio, respetivamente, na amostra. As Figura 3.1C e Figura 3.1D representam o mapeamento do carbono e oxigénio, respetivamente, no papel Whatman nº1. A intensidade de cor nos mapeamentos corresponde à deteção de cada elemento na amostra analisada. A utilização da técnica de EDS indica o carbono e oxigénio como únicos constituintes do papel Whatman nº1. Esta técnica não permite detetar hidrogénio, elemento constituinte, juntamente com carbono e oxigénio, da glucose, monómero da celulose.

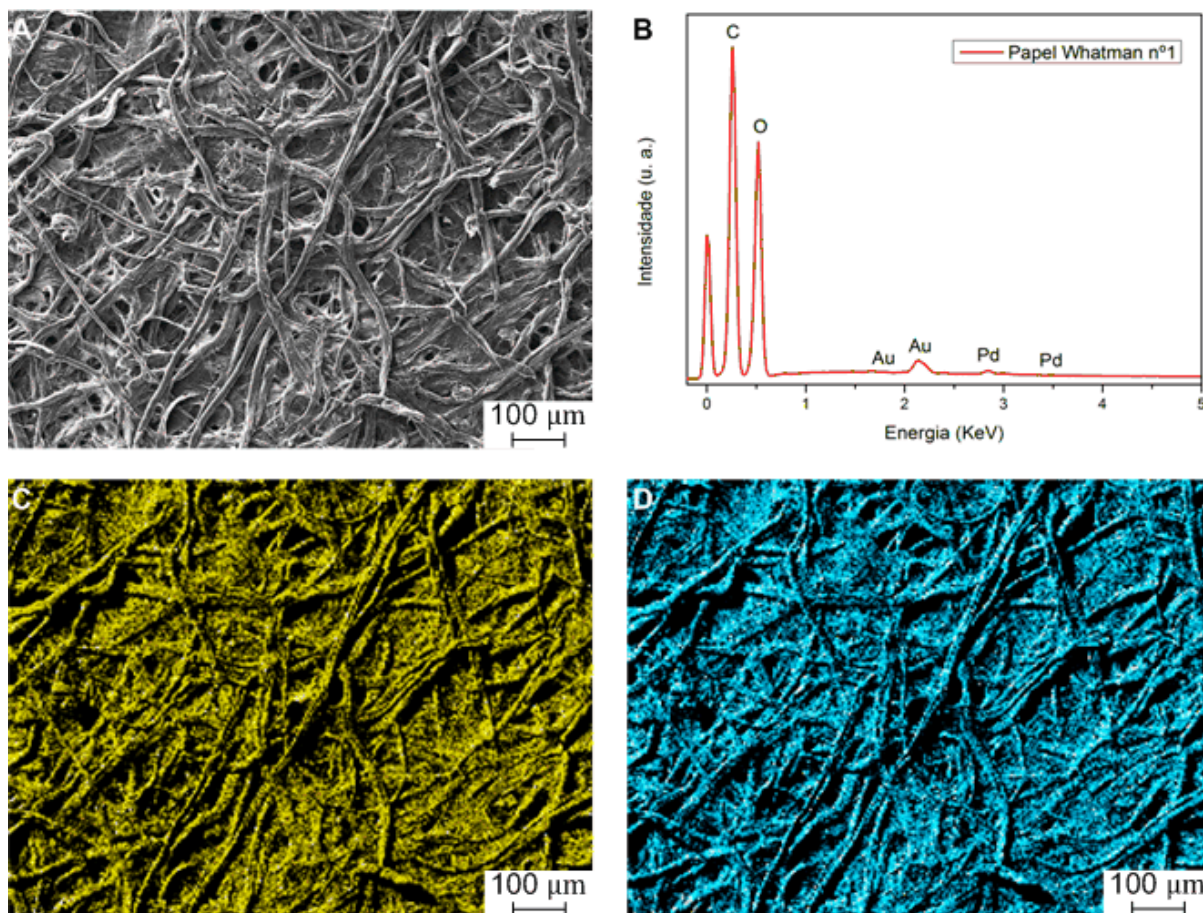


Figura 3.1: A) Imagem SEM da zona de papel analisada por EDS; B) Espectro de EDS de papel, cortado a E=5 keV; C) Mapeamento de carbono na amostra de papel; D) Mapeamento de oxigénio na amostra de papel.

A Figura 3.2A representa a zona do suporte com pó de celulose analisada por EDS. O pó foi depositado num suporte de silício, depois de suspenso em propanol, antes de ser analisado através do equipamento de SEM. Ao contrário do papel Whatman nº1 o pó de celulose não apresenta uma malha de fibras. As suas fibras são menores e não estão interligadas. Os picos do espectro da Figura 3.2B para energias superiores a 1,5 KeV correspondem aos elementos silício, ouro e paládio. A presença de silício justifica-se com a utilização do suporte para a amostra. O ouro e o paládio, tal como no papel Whatman nº1, foram utilizados para cobrir a amostra. A intensidade do pico correspondente ao silício é resultado da área ocupada pelo suporte na zona analisada, visível na Figura 3.2A. Por fim, os picos que fornecem informação sobre o material são os correspondentes às energias 0,277 keV e 0,525 keV, características do carbono e oxigénio, respetivamente. Os mapeamentos de elementos da Figura 3.2C e Figura 3.2D mostram a distribuição do carbono e oxigénio na amostra. Estes resultados indicam que o pó de celulose contém apenas carbono e oxigénio, constituintes de glucose em conjunto com hidrogénio.

Através da técnica de EDS foram identificados apenas os elementos constituintes da glucose nos materiais analisados.

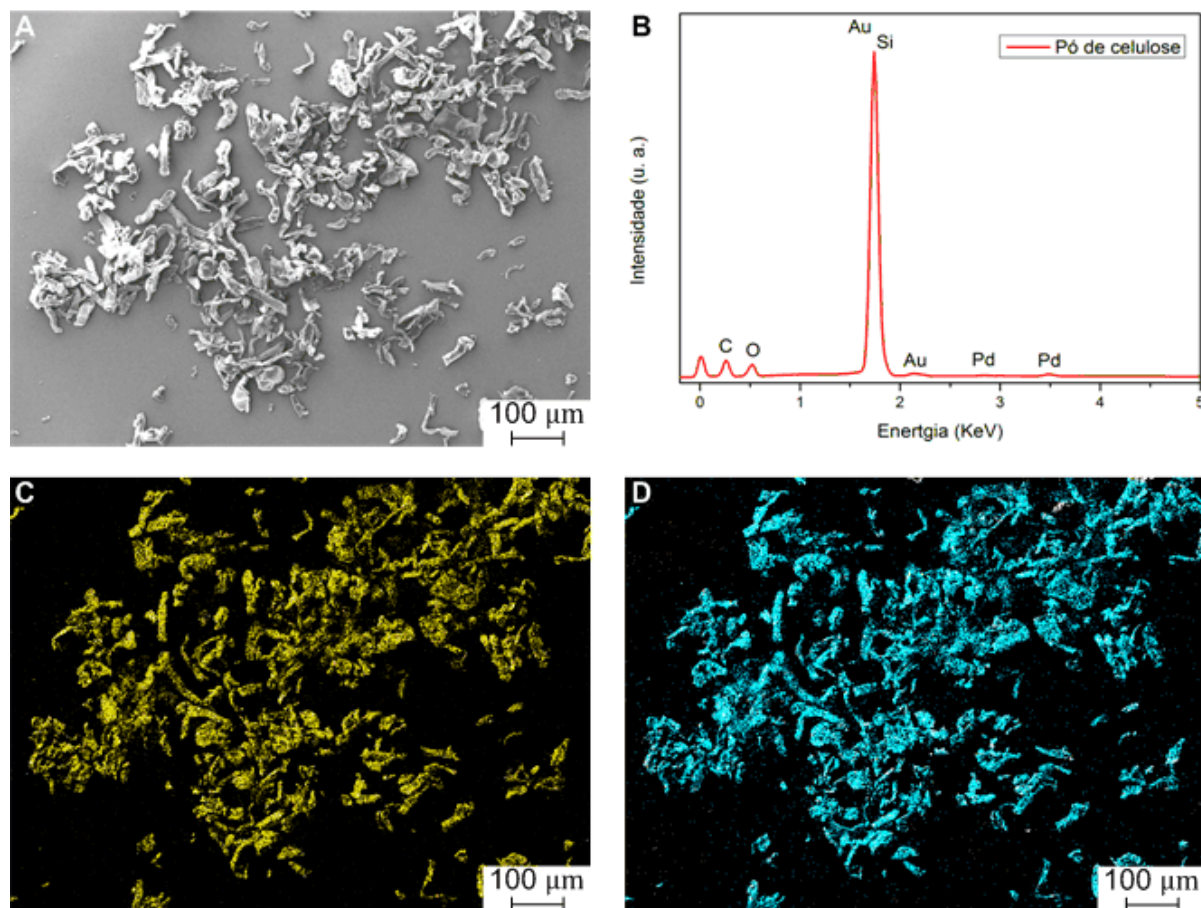


Figura 3.2: A) Imagem SEM da zona de pó de celulose analisada por EDS; B) Espectro de EDS de pó de celulose, cortado a E=5 keV; C) Mapeamento de carbono na amostra de pó de celulose; D) Mapeamento de oxigênio na amostra de pó de celulose.

3.1.2. Fluorescência de raios-X

A técnica de FRX foi utilizada para complementar a informação elementar obtida através de EDS. Os resultados de FRX estão representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Concentração relativa dos elementos presentes nos materiais estudados com a técnica de FRX

Elemento químico	Papel Whatman (%)	Pó de celulose (%)
S	-	7
Cl	-	18
Ca	100	75
Total	100	100

O resultado da fluorescência de raios-X no papel indica apenas a presença de cálcio na sua estrutura. A presença deste mineral pode ser justificada com processos de tratamento do produto, como aditivos de consistência ou mesmo branqueamento [14], [20]. No caso do pó de celulose a técnica utilizada indica a presença majoritária de cálcio mas também de enxofre e cloro. A presença de enxofre pode estar ligada a processos em meio ácido de remoção de lenhina das fibras de celulose do pó de celulose [14]. O cloro é utilizado, na fabricação de papel, principalmente através do composto dióxido de cloro. Este composto atua sobre a pasta de papel proveniente de tratamentos mecânicos e químicos, com o propósito de branquear e aumentar o brilho das fibras de celulose [14], [20]. A pasta que vai dar origem ao papel sofre vários processos de recuperação das substâncias utilizadas para a sua síntese, de maneira a purificar o papel produzido [14]. Ainda assim, não há uma remoção completa desses compostos, o que justifica os resultados desta técnica. A técnica de FRX detetou elementos diferentes da técnica de EDS. Esses elementos são, teoricamente, possíveis de detetar por ambas as técnicas, o que leva a crer que a sua quantidade presente na amostra seja muito baixa. O conjunto de resultados indica materiais com elevado grau de pureza face à ausência ou baixa quantidade de elementos como agentes contaminantes. A celulose é um polímero higroscópico, cuja conformação em fibras permite a condução de soluções por capilaridade. A presença de outros constituintes no papel e pó podem influenciar as propriedades hidrófilas destes materiais.

3.1.3. Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier

A técnica de FTIR permite identificar as ligações químicas entre elementos, complementando a informação já recolhida acerca dos materiais. Obtiveram-se espectros FTIR com a utilização do módulo ATR para amostras de papel Whatman nº1 e pó de celulose. O número de onda do feixe incidente variou entre 500 e 4000 cm^{-1} . As amostras de papel Whatman nº1 e de pó de celulose foram colocadas no porta-amostras do módulo ATR. Os espectros obtidos foram alvo de uma correção automática da linha de base e uma correção avançada de ATR. A correção de ATR teve como base o ângulo de incidência do feixe no cristal do módulo, 42°, o tipo de cristal, diamante e o índice de refração da amostra. O índice usado foi de 1,47 [67], [68]. O software utilizado para obter e tratar os espectros foi o OMNIC Suite da Thermo Scientific. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 3.3.

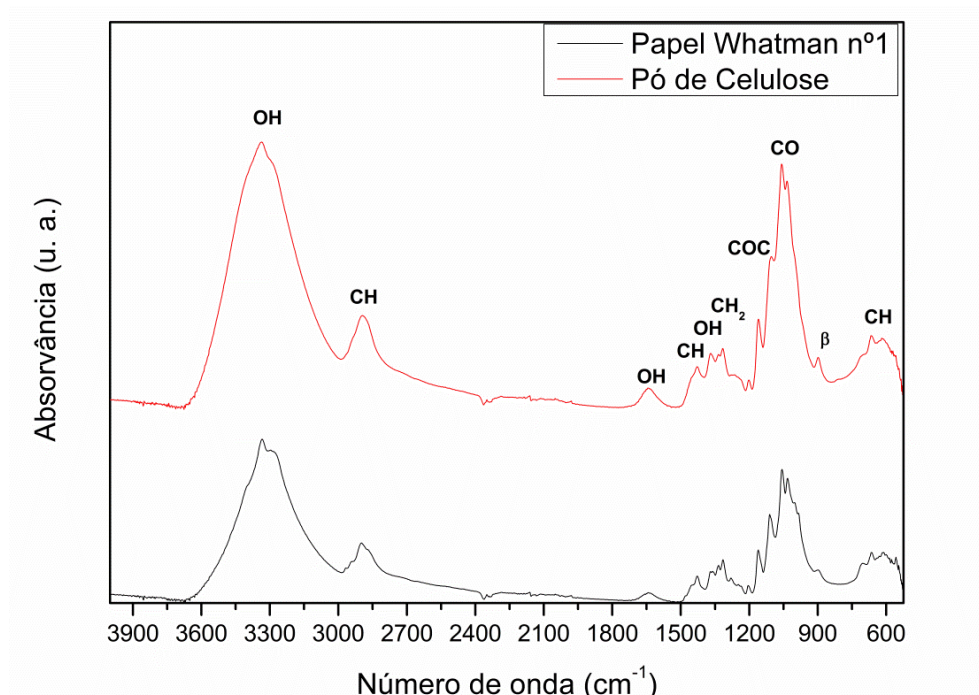


Figura 3.3: Espectros FTIR do papel Whatman nº1 e do pó de celulose.

Ao comparar, na Figura 3.3, os espectros das duas amostras, é notória a sua semelhança. Apesar das diferenças de absorvância, os compostos apresentam bandas nas mesmas posições. Um facto que pode justificar a diferença de intensidade dos picos dos dois espectros é a diferença de densidade das duas amostras quando submetidas a pressão por parte do módulo de ATR.

Devido à semelhança entre os espectros, no que toca às posições das bandas, não se vai individualizar as suas análises. Na região compreendida entre números de onda de 4000 e os 2500 cm^{-1} manifestam-se as ligações do átomo de hidrogénio a outros elementos sobre a forma de estiramento. O átomo de hidrogénio tem um peso muito menor em relação aos outros átomos que constituem compostos orgânicos. A ligação deste sistema (H-X) precisa de mais energia, em relação às outras ligações, para ser destabilizada. Na Figura 3.3 é possível identificar dois picos distintos nesta região. Esses picos correspondem à ligação hidrogénio-oxigénio, por volta dos 3335 cm^{-1} , e à ligação hidrogénio-carbono, por volta de 2900 cm^{-1} . É na região entre os 2500 e os 2000 cm^{-1} que as vibrações das ligações covalente triplas se manifestam. Como esperado, não se identifica nenhuma banda nesta região dos espectros obtidos. As ligações duplas manifestam-se, normalmente, entre os 2000 e os 1500 cm^{-1} . Ainda assim, em materiais poliméricos é usual a presença nesta zona do estiramento de ligações de carbono e da deformação de ligações de hidrogénio. Nos espectros da Figura 3.3 identifica-se um pico na zona dos 1640 cm^{-1} que corresponde à ligação de oxigénio com hidrogénio nas moléculas de água adsorvidas pelas amostras.

A região entre 1500 e 600 cm^{-1} é conhecida como a impressão digital dos compostos. Na Figura 3.3 é possível verificar que os espectros têm um comportamento muito semelhante, mesmo nesta região.

Entre os números de onda entre 1500 e 1200 cm^{-1} foram identificados cinco picos. Os picos 1430 e 1370 cm^{-1} correspondem às deformações assimétrica e simétrica, respetivamente, da ligação C-H. O pico a 1335 cm^{-1} é uma consequência da deformação coplanar da ligação O-H. O pico a 1315 cm^{-1} corresponde ao balançar (*wagging*) das ligações de CH_2 . O último pico deste grupo situa-se nos 1201 cm^{-1} . Resulta da manifestação da deformação da ligação O-H.

Entre os números de onda 1200 e 1000 cm^{-1} verificam-se quatro picos de maior intensidade. O pico a 1160 cm^{-1} corresponde à vibração assimétrica do grupo C-O-C pertencente ao anel de glucose. O pico a 1110 cm^{-1} é uma consequência do estiramento assimétrico do anel de D-glucose. O pico de 1059 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-O. O mesmo fenómeno provoca o pico de 1033 cm^{-1} . Abaixo dos 1000 cm^{-1} existe um pico a 898 que é provocado pelo estiramento do anel da D-glucose. Este pico também é característico da ligação β , tipo de ligação entre os anéis D-glucose. Por último, o pico situado nos 665 cm^{-1} é também apontado como característico de β -D-glucose, devendo-se provavelmente ao balançar da ligação C-H [59], [69–71].

A utilização desta técnica identificou as ligações químicas da celulose em ambos os materiais. Não foram identificados picos relevantes que não correspondam a ligações existentes na celulose, de acordo com as outras técnicas complementares de análise utilizadas.

3.1.4. Difração por raios-X

Com a utilização da técnica de DRX pretende-se fazer uma análise estrutural das amostras em estudo, que complemente a informação obtida nas técnicas anteriores. Pretende-se identificar as estruturas cristalinas presentes nas amostras. Foi utilizado o equipamento X'Pert Pro da PANalytical, que emite radiação Cu K_{α} . O padrão de difração foi adquirido para ângulos 2θ entre 10° e 80°.

Os difratogramas obtidos de uma amostra de papel Whatman nº1 e de pó de celulose encontram-se na Figura 3.4.

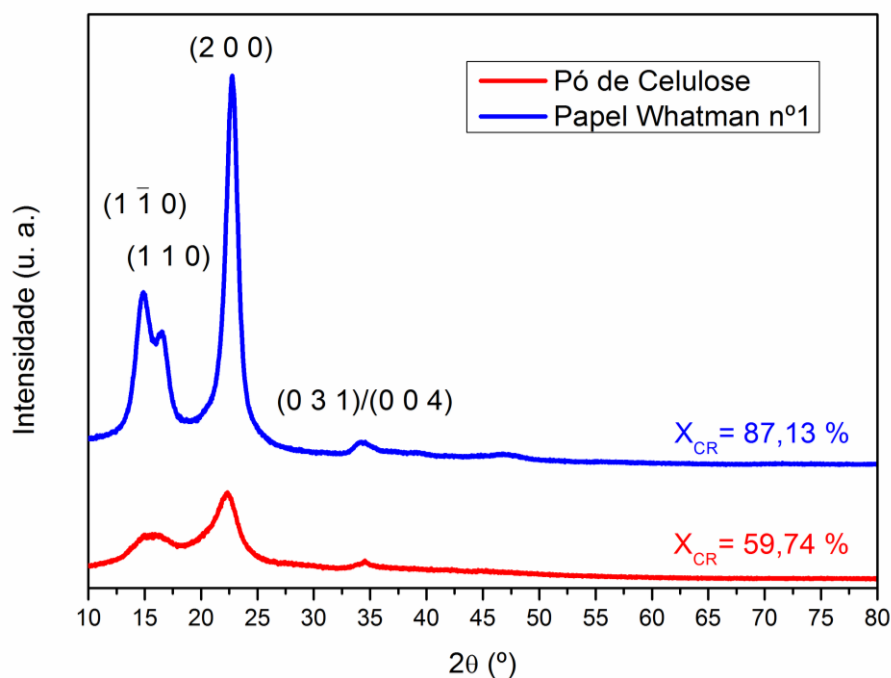


Figura 3.4: Difratomogramas do papel Whatman nº1 e do pó de celulose.

A presença de picos nos difratogramas da Figura 3.4 confirma a existência de estruturas cristalinas na constituição dos materiais estudados. A análise feita em técnicas anteriores aponta para celulose como o principal constituinte destes materiais. A celulose pode-se encontrar no tipo I ou no tipo II no que toca à sua cristalinidade. A celulose tipo II é uma transformação mais estável que o tipo I. Contudo, é no tipo I que a celulose proveniente de fibras vegetais se encontra, antes de qualquer tratamento que a possa transformar no tipo II. Enquanto a celulose tipo I é uma estrutura cristalina, a celulose tipo II é amorfa. A celulose tipo I divide-se em dois tipos de estrutura cristalina, celulose I_β e celulose I_α . A celulose I_β é uma estrutura monoclinica, a celulose I_α é uma estrutura triclínica. Estes dois tipos podem coexistir estruturalmente [72], [73].

O difratograma do papel Whatman nº1 apresenta quatro picos, nas posições 2θ de 14,84°, 16,48°, 22,72° e 34,30°. Estes picos são característicos da celulose I_β e correspondem aos planos cristalográficos $(1 \bar{1} 0)$, $(1 1 0)$, $(2 0 0)$ e $(0 3 1)$ ou $(0 0 4)$, respetivamente [70], [72], [73]. O facto dos dois primeiros picos do difratograma apresentarem uma boa resolução é uma indicação para um alto teor de celulose tipo I no que toca à constituição do material [70], [73].

No caso do pó de celulose, o difratograma tem também quatro picos distintos. As suas posições, de 2θ , são 14,83°, 16,70°, 22,12° e 34,47° e correspondem, respetivamente, aos planos cristalográficos $(1 \bar{1} 0)$, $(1 1 0)$, $(2 0 0)$ e $(0 3 1)$ ou $(0 0 4)$ [70], [72], [73]. Estamos perante o mesmo tipo de estrutura de celulose que se identificou no papel Whatman- celulose I_β . Contudo, neste caso, os dois primeiros picos têm uma resolução muito mais fraca sendo mesmo

impossível de distingui-los ao analisar o difratograma. Este facto pode ser interpretado com a presença de estruturas amorfas na constituição do pó de celulose como lenhina, hemicelulose ou mesmo celulose amorfa o que indica fontes de celulose ou tratamentos durante o processo de fabricação diferentes para os dois materiais [70].

O índice de cristalinidade (X_{CR}) dos materiais estudados foi calculado de acordo com o método empírico de Segal, utilizando a equação [70]:

$$X_{CR} = \frac{I_{200} - I_{AM}}{I_{200}} \times 100 \quad \text{Eq. 3.1}$$

onde I_{200} , que representa as partes cristalinas e amorfas da celulose, é a altura do pico correspondente ao plano cristalográfico (2 0 0) que ocorre em $2\theta = 22,7^\circ$ e I_{AM} , que representa apenas a parte amorfa da celulose, é a altura mínima entre os picos correspondentes aos planos cristalográficos (2 0 0) e (1 1 0) [70]. Os índices de cristalinidade calculados para os dois materiais podem ser consultados na Figura 3.4.

Com a utilização desta técnica reforçou-se o pressuposto dos materiais em estudo serem constituídos principalmente por celulose. Verificou-se também que há diferenças entre o tipo de estrutura de celulose presente em cada amostra, o que indica diferentes fontes de fibras ou tratamentos no processo de fabricação.

3.1.5. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento foi utilizada para observar a morfologia de superfícies dos materiais em estudo. Foram utilizados uma tensão de aceleração de 2 kV, uma abertura de diafragma de 30 μm e uma distância de trabalho de cerca de 5 mm. As amostras foram cobertas com ouro e paládio. Na Figura 3.5 observam-se as imagens obtidas para papel Whatman nº1 e pó de celulose. Nas imagens da Figura 3.5A e Figura 3.5B é notória a rede de fibras de celulose que forma o papel Whatman nº1. A disposição das fibras é claramente horizontal, uma consequência do processo de fabrico de folhas de papel [14]. Verifica-se também uma elevada porosidade bem como a ausência de resinas na estrutura, elementos fundamentais no que toca à estrutura de um papel de cromatografia [74].

Nas figuras Figura 3.5C e Figura 3.5D verifica-se uma estrutura completamente diferente da observada nas imagens anteriores. Neste caso há uma dispersão de partículas de uma maneira aleatória. Essas partículas são, também, fibras de celulose. Contudo, o seu comprimento é consideravelmente inferior em relação às fibras que constituem o papel.

Morfologicamente o papel Whatman nº1 e o pó de celulose apresentam estruturas completamente diferentes, como seria de esperar. Esta diferença entre os materiais é uma vantagem no que toca às suas finalidades, enquanto constituintes de um biossensor 3D.

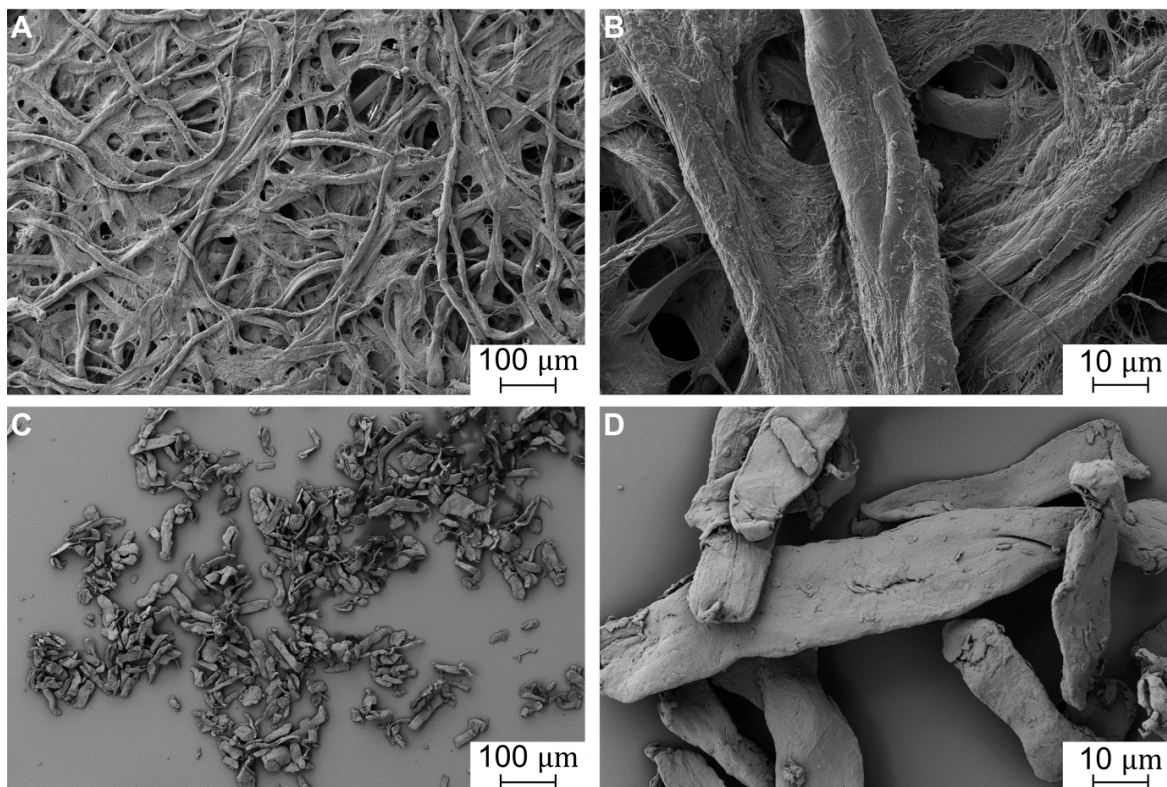


Figura 3.5: Conjunto de imagens obtidas por SEM. A) e B) papel Whatman nº1; C) e D) pó de celulose.

3.1.6. Ângulo de contacto

Procurou-se obter o ângulo de contacto dos materiais em estudo de maneira a verificar a sua afinidade com a água. É de extrema importância verificar as propriedades hidrófilas destes materiais, já que a sua função num biossensor é transportar as soluções aquosas a analisar.

Foi depositada uma gota com um volume de 2 μL sobre uma amostra de papel Whatman nº1 e medido o ângulo de contacto do sistema (papel, água e ar).

No caso do pó de celulose foi criada uma superfície plana do pó sobre um suporte de vidro e depositada uma gota com um volume de 2 μL sobre a mesma. Tentou-se medir o ângulo de contacto do sistema e comparar com o do papel Whatman nº1.

A relação dos materiais em estudo com água destilada é observada na Figura 3.6.

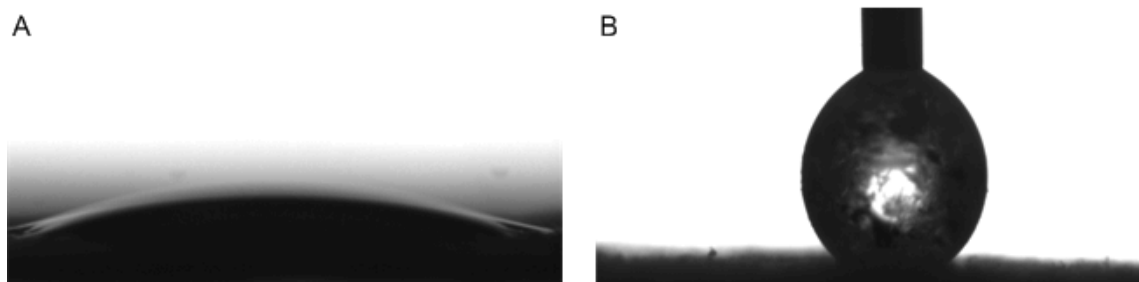


Figura 3.6: Imagens da relação entre os materiais em estudo e água. A) Papel Whatman nº1; B) pó de celulose

Não foi possível determinar com exatidão o ângulo de contacto no sistema montado com papel Whatman nº1. A gota de água destilada depositada no papel foi imediatamente absorvida. Apesar da alta frequência com que a câmara do equipamento usado obteve imagens consecutivas da interação das três fases em jogo, não foi possível isolar uma imagem que permitisse a obtenção de um ângulo de forma clara.

A imagem correspondente ao papel Whatman nº1, representada na Figura 3.6^a, foi obtida no momento em que a gota de água deixou de contactar a ponta da seringa do equipamento e a superfície do volume de água estabilizou. O ângulo de contacto obtido pelo estudo desta imagem situa-se no intervalo de 10° a 15°.

Também foi impossível obter um ângulo de contacto no ensaio com pó de celulose. Neste caso, as fibras soltas constituintes do pó foram absorvidas pela gota de água, aquando do seu contacto.

Apesar de não se ter obtido um ângulo de contacto nos ensaios realizados é notória a afinidade dos materiais com a água. O sistema com papel Whatman apresenta um ângulo de contacto num intervalo classificado como extremamente hidrófilo [75]. O comportamento das fibras do pó de celulose, no contacto com água, é também esclarecedor quanto à hidrofília do material.

3.2. Materiais hidrófobos

Para controlar o fluxo de um líquido num biossensor, cujo substrato é hidrófilo, torna-se necessário criar barreiras hidrófobas que limitem o circuito. Neste trabalho, essas barreiras são constituídas por cera e adesivo. A cera utilizada foi a dos cartuchos de tinta sólida Xerox ColorQube Ink (Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA), próprios para a impressora Xerox ColorQube 8570 (Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA), utilizada neste trabalho. De maneira a difundir a cera no papel e assim criar barreiras hidrófobas, foi utilizada uma placa de aquecimento Heidolph MR Hei-Tec (Heidolph, Schwabach, Germany). Foram utilizados três adesivos diferentes de dupla face, todos de marca branca e com um valor de aquisição por rolo

inferior a 1 €. Os adesivos foram designados como P, M e G, devido às diferentes larguras (pequena, média e grande). Os adesivos P e M são transparentes, enquanto que o adesivo G é branco e opaco.

É fundamental caracterizar a hidrofobia da cera e dos adesivos utilizados de maneira a assegurar as suas funções como limitadores de percurso para soluções aquosas.

3.2.1. Ângulo de contacto

A hidrofobia dos três adesivos e da cera, utilizados neste trabalho, foi estudada através da medição do seu ângulo de contacto com água destilada. As três amostras de adesivo estudadas (P, M e G) foram coladas sobre papel Whatman nº1. A cera foi impressa em duas amostras de papel Whatman nº1. Numa das amostras, a cera foi difundida no papel durante 2 minutos, com o recurso a uma placa de aquecimento a 120°C.

Foram depositados 2 µL de água destilada em cima das amostras a analisar. A Figura 3.7 mostra os resultados para os adesivos.

As três amostras formam ângulos de contacto com a água superiores a 90°, o que significa que se trata de materiais hidrófobos. Os adesivos são usados na construção de biossensores 3D para unir camadas de papel e permitir o fluxo vertical em pontos específicos, sendo imprescindível a sua hidrofobia.

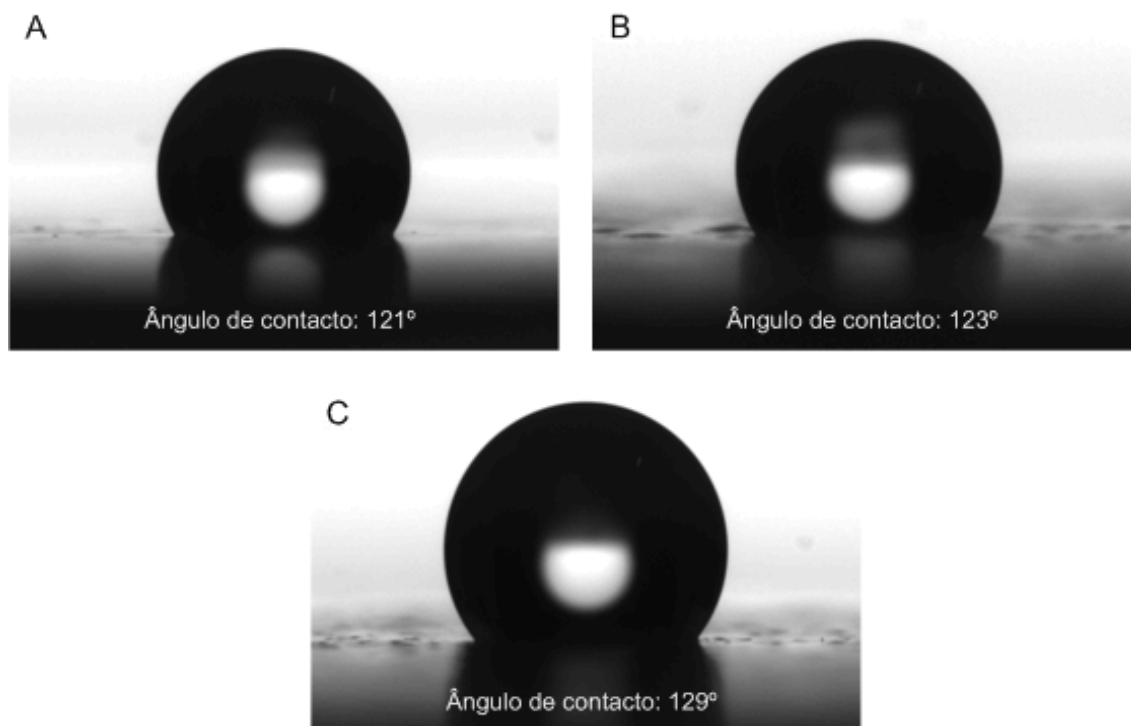


Figura 3.7: Ângulos de contacto dos sistemas em estudo: A) Adesivo G; B) Adesivo M; C) Adesivo P.

A Figura 3.8 mostra os resultados para as amostras de cera. Tal como os adesivos, a cera apresenta ângulos de contacto superiores a 90° que definem o seu carácter hidrófobo. A cera impressa no papel apresenta um ângulo de contacto com água inferior à cera difundida.

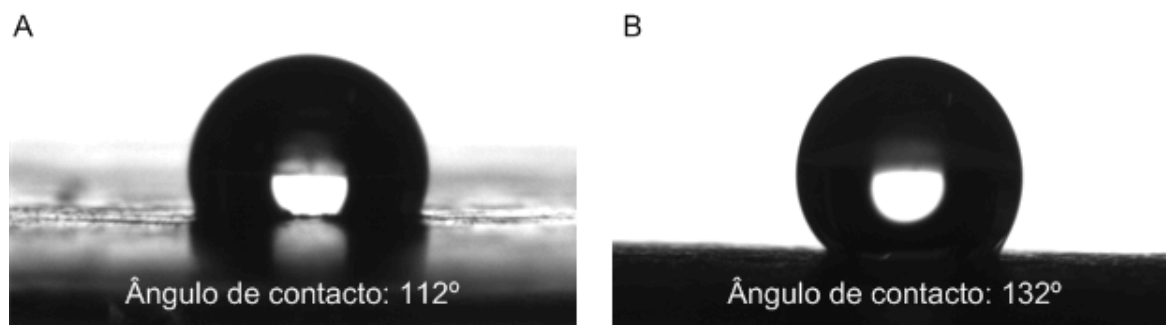


Figura 3.8: Ângulos de contacto dos sistemas em estudo: A) Cera impressa em papel Whatman nº1; B) Cera difundida em papel Whatman nº1.

3.2.2. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento foi utilizada para visualizar a morfologia superficial dos materiais hidrófobos. Na Figura 3.9, as imagens de SEM mostram a morfologia de superfície dos três adesivos estudados. Os adesivos foram colados em papel Whatman nº1. A morfologia dos adesivos é idêntica. Cobrem as fibras do papel como um manto, de uma forma contínua. A sua função nos biossensores 3D é aderir camadas de papel e isolar os canais das mesmas. Com a hidrofobia verificada através da medição do ângulo de contacto e a continuidade observada nas imagens de SEM, os adesivos de dupla face estudados têm as características necessárias para a sua finalidade como parte integrante de um biossensor 3D.

A Figura 3.10 mostra as imagens SEM obtidas para cera depositada à superfície de papel Whatman nº1 e cera difundida no papel.

A cera apresenta uma morfologia de superfície uniforme, Figura 3.10A. Quando impressa no papel apresenta-se como uma camada contínua com algumas falhas, Figura 3.10B. Após a sua difusão no papel a cera acumula-se em redor das fibras de papel adotando a sua morfologia, Figura 3.10C.

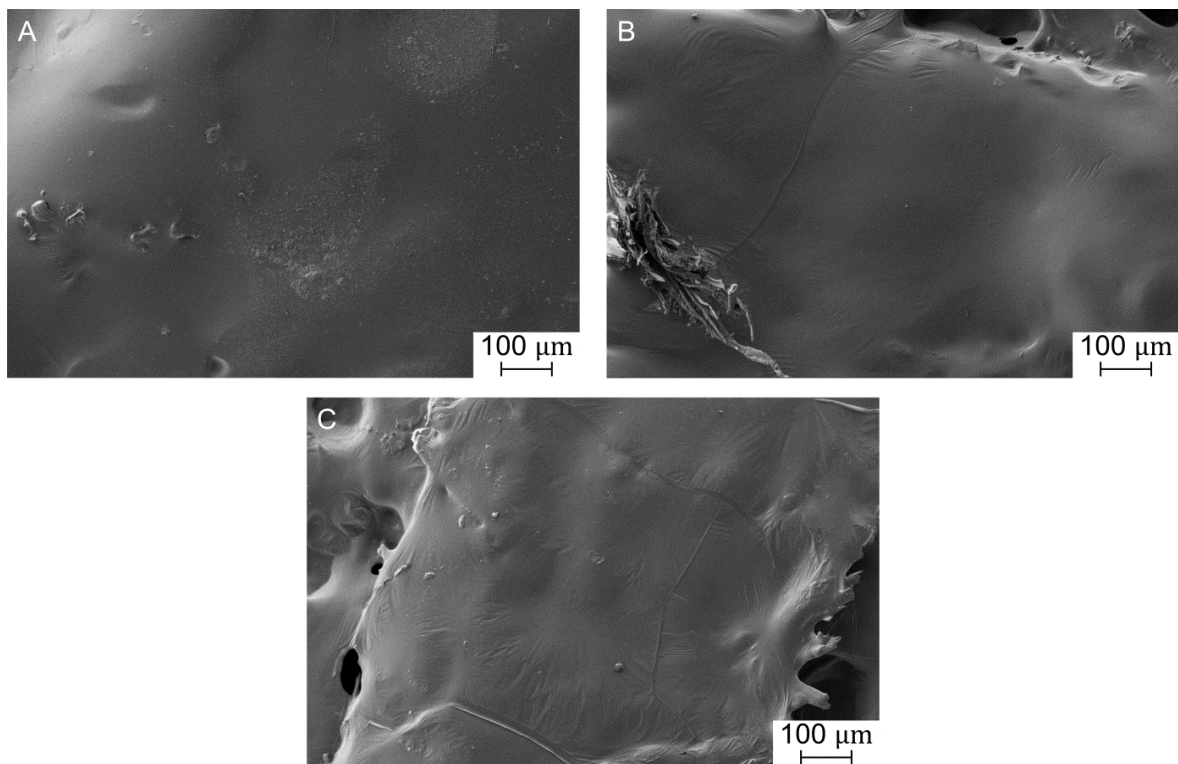


Figura 3.9: Imagens sem dos diferentes adesivos sobre papel whatman nº1: A) Adesivo G; B) Adesivo M; C) Adesivo P.

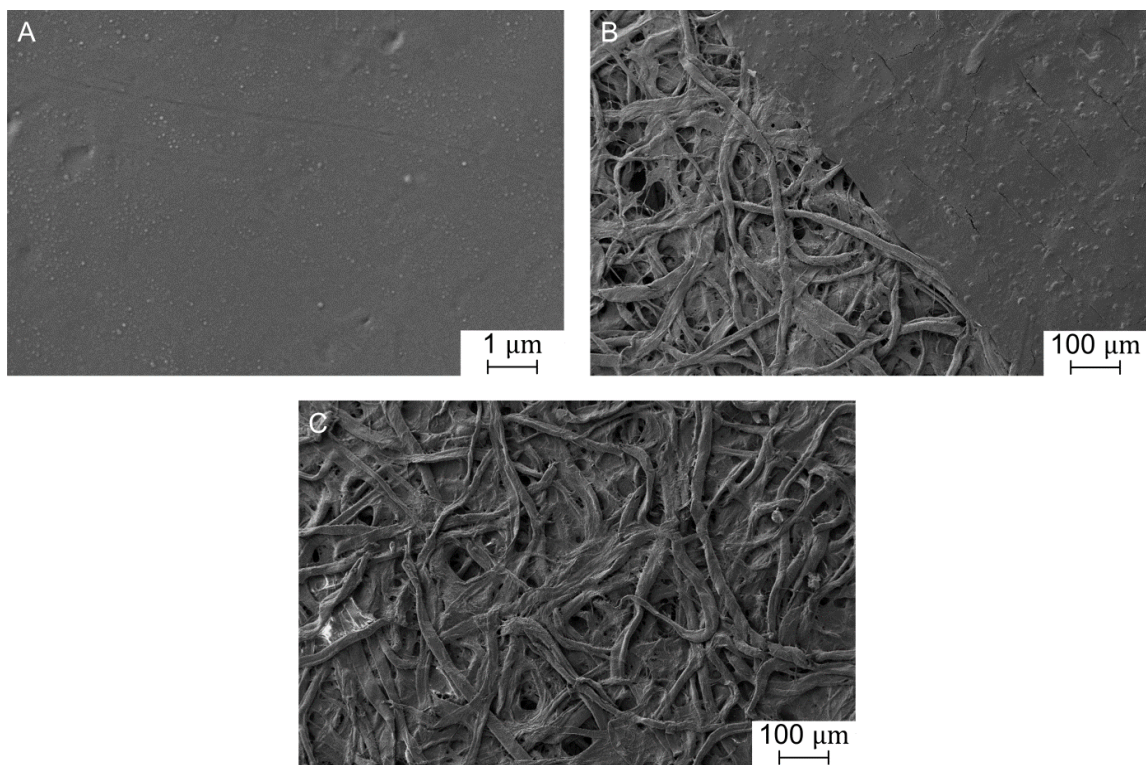


Figura 3.10: Imagens SEM da cera e do papel: A) Amostra de cera; B) Cera impressa em papel Whatman nº1; C) Cera difundida em papel Whatman nº1.

4.Desenvolvimento de biossensores 3D

4.1. Montagem de um biossensor 3D

A montagem dos biossensores 3D desenvolvidos neste trabalho envolve a preparação de cada constituinte e a ligação entre eles. Os constituintes são agrupados por: A) camadas de papel; B) camadas de adesivo; C) pó de celulose, agente que assegura a ligação de canais intercamadas. A preparação dos constituintes inicia-se pelo desenho dos padrões que vão dar forma aos canais do biossensor. Estes padrões podem ser desenhados recorrendo a programas de desenho como o Adobe Illustrator ou Microsoft Visio. Após definidos os padrões, são impressos no papel através de uma impressora a cera Xerox ColorQube 8570 e sujeitos a uma temperatura superior ao ponto de fusão da cera, de maneira a criar barreiras hidrófobas a partir das impressões no papel. No caso do adesivo criam-se orifícios que permitem a ligação das camadas de papel em pontos específicos. Para criar os buracos nos adesivos pode-se utilizar um furador, radiação solar concentrada por uma lupa ou uma máquina de corte a laser, como a utilizada neste trabalho: VLS 3.50 (Universal Laser Systems, Scottsdale, Arizona, USA).

A montagem do biossensor 3D consiste na sobreposição alternada de camadas de papel com camadas de adesivo. Os orifícios das camadas de adesivo, entre camadas de papel, são preenchidos com pó de celulose. Desta maneira, assegura-se a ligação das camadas hidrófilas constituídas por papel.

Os reagentes que vão funcionalizar o biossensor são depositados nas zonas hidrófilas de maneira a otimizar as reações necessárias para identificar ou quantificar a substância pretendida.

A Figura 4.1 mostra os passos para a preparação de constituintes de um exemplo de formato para biossensores 3D.

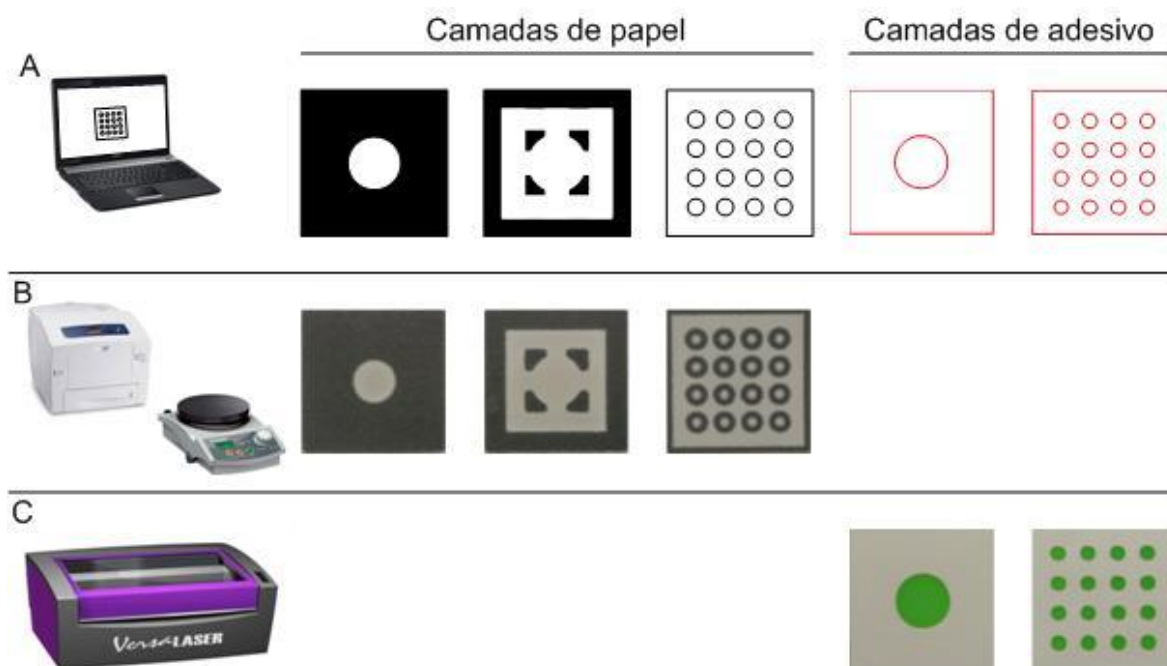


Figura 4.1: Preparação dos constituintes de um biossensor 3D: A) Os padrões das camadas são desenhados com recurso a software próprio; B) As camadas de papel são preparadas através da impressão a cera dos padrões desenhados e posterior difusão da cera através de uma placa de aquecimento; C) As camadas de adesivo são sujeitas a corte com recurso a uma máquina de corte a laser.

A Figura 4.2 esquematiza o processo de montagem dos constituintes preparados. Na Figura A3 do Anexo A encontram-se camadas de papel nas mesmas condições das apresentadas na Figura 4.2.

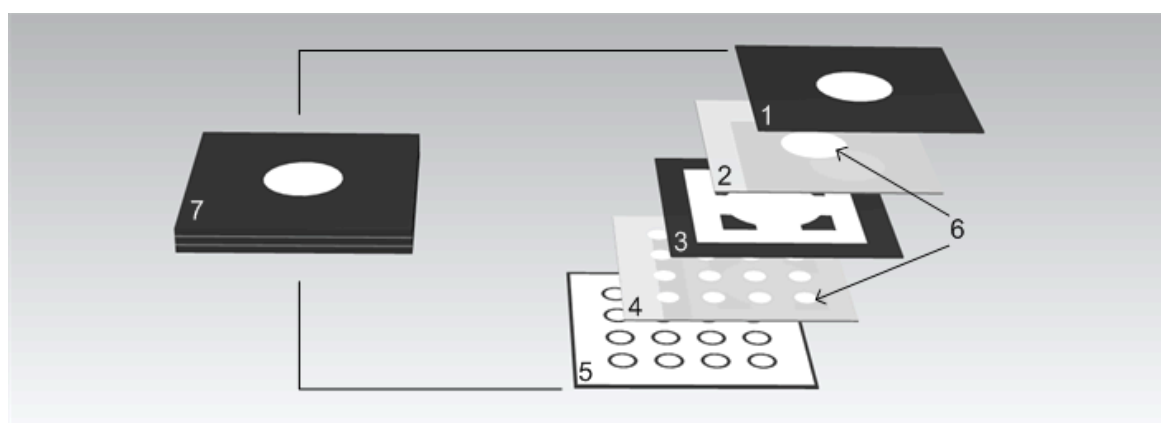


Figura 4.2: Montagem do biossensor 3D: 1) Zona de depósito da solução a analisar – camada de papel; 2) e 4) Camada de adesivo; 3) Camada de Papel; 5) Zona de análise – Camada de papel; 6) Poços das camadas de adesivo preenchidas com pó de celulose; 7) Biossensor 3D montado.

Na montagem do exemplo de formato apresentado para um biossensor 3D o pó de celulose, previamente misturado com corante alimentar (Globo), foi inserido nos orifícios da camada de adesivo número quatro da Figura 4.2. O dispositivo foi percorrido por 30 μ L de uma solução de corante alimentar diluído em água. A Figura 4.3 mostra a zona de análise (camada de papel número 5 da Figura 4.2) antes e depois do ensaio.

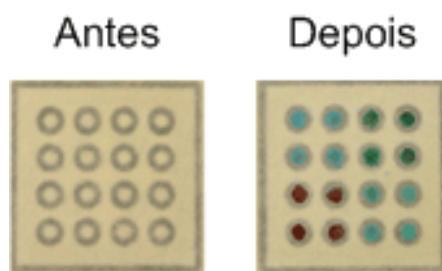


Figura 4.3: Zona de análise do exemplo de formato para biossensores 3D apresentado antes e depois do ensaio.

4.2. Interação entre papel e cera

4.2.1. Canais - difusão da cera no papel

Os canais que conduzem soluções aquosas nas camadas de papel constituintes de um biossensor 3D são construídos através da impressão e difusão de cera. Assim, o desenho e funcionalização de uma barreira estão dependentes da quantidade impressa e do tempo e temperatura a que ocorre a difusão. Neste trabalho, os processos de impressão foram efectuados com qualidade de fotografia. Para criar barreiras utilizou-se o modo de impressão *Pre-Punched*², enquanto que para a criação de poços utilizou-se o modo *Plain Paper*².

Segundo resultados obtidos previamente no nosso grupo, a cera utilizada neste trabalho apresenta um ponto de fusão de cerca de 80°C [40]. O estudo efectuado para definir o comportamento de linhas impressas de cera, quando difundida no papel, está apresentado na Figura 4.4. Na Figura A4 do Anexo A são apresentados exemplos de linhas e barreiras realizadas nas mesmas condições das estudadas e apresentadas na Figura 4.4.

² Os termos *Pre-Punched* e *Plain Paper* dizem respeito a dois modos de impressão programados pela marca Xerox para serem utilizados em determinados tipos de papéis.

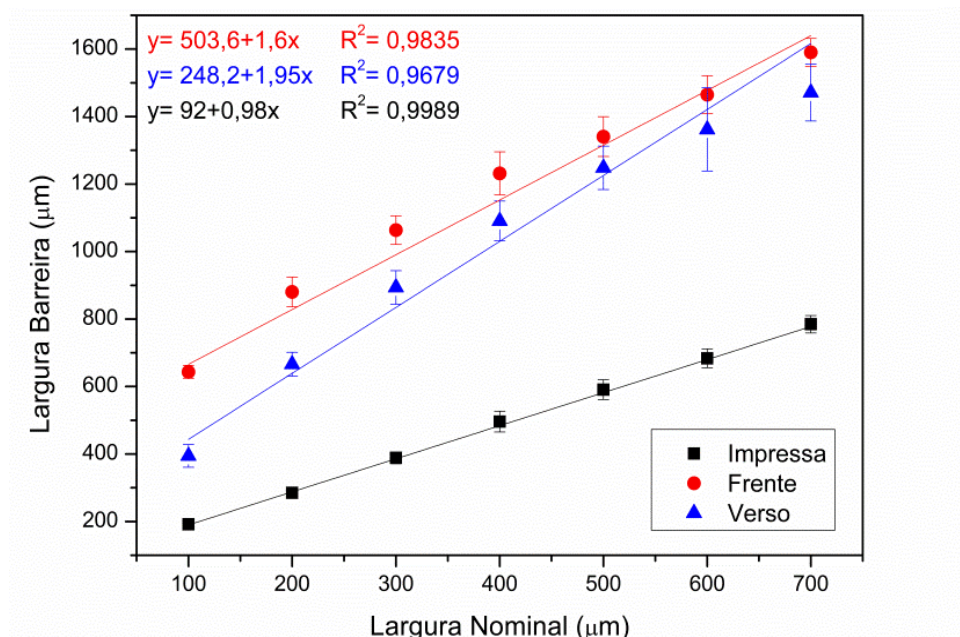


Figura 4.4: Largura das linhas após impressão e das barreiras (frente e verso do papel) após difusão a 140 °C durante 2 minutos, em função da largura nominal das linhas [40].

A espessura mínima da linha de cera impressa no papel que assegura a formação de uma barreira hidrófoba, para temperaturas superiores a 100 °C durante pelo menos 2 minutos, é de 200 μm [40]. A largura mínima do canal formado por barreiras que assegura a movimentação de uma solução aquosa por capilaridade no papel de cromatografia Whatman nº1 é de cerca de 500 μm.

No caso da construção de poços rodeados por uma quantidade contínua de cera, como é exemplo o poço da camada número 1 da Figura 4.2, o comportamento da difusão da cera em função da temperatura e tempo a que é sujeito a essa temperatura está descrito na Tabela 4.1. Podem ser consultados exemplos de poços construídos nas condições apresentadas na Tabela 4.1 na Figura A5 do Anexo A.

Tabela 4.1: Diferença média (d médio) entre o raio de um poço rodeado de cera impresso e difundido em função da temperatura e tempo de difusão [76].

Temperatura (°C)	Tempo de difusão (s)	d médio (μm)
80	60	84,01 ± 24,99
	120	114,84 ± 35,60
100	60	214,73 ± 53,92
	120	373,54 ± 61,78
120	60	429,67 ± 22,94
	120	570,71 ± 33,61
140	60	545,36 ± 36,03
	120	669,24 ± 33,78

As condições mínimas de difusão que verificam a eficácia dos poços, ou barreiras circulares, quanto à contenção de soluções aquosas no papel, são uma temperatura de 100 °C e um tempo de 120 segundos. Para temperaturas superiores a 100 °C e tempos de pelo menos 60 segundos, as barreiras criadas são funcionais [76].

4.2.2. Encapsulamento dos canais

A proteção nos biossensores, através do encapsulamento dos seus canais, é importante para evitar a contaminação dos reagentes e proteger o dispositivo de danos físicos [66]. Para manter as características ASSURED (secção 1.3.1) foi estudada a hipótese de encapsulamento dos canais com o mesmo material que os forma, a cera para impressão.

Existem vários problemas devido à exposição dos canais do biossensor ao ambiente: 1) os canais estão expostos durante a fabricação, transporte e execução o que aumenta o risco de contaminação; 2) o fluido a analisar está exposto ao fenómeno de evaporação o que diminui o seu volume e minimiza a distância que este pode percorrer no papel; 3) biossensores com canais desprotegidos não podem contactar com superfícies externas pois a solução alvo de análise poderá fluir para essas superfícies, o que se traduz na perda de volume de análise e/ou possível contaminação da amostra [66].

O encapsulamento envolve a diminuição da exposição dos ensaios às condições ambiente mas também condiciona o volume dos canais. Torna-se assim importante estudar a influência deste factor no fluxo de uma solução.

Foi ainda estudada a possibilidade de proteção dos canais das camadas de papel em relação às camadas de adesivo através do encapsulamento.

4.2.2.1. Materiais e Procedimento experimental

Foram desenhados, no software Microsoft Visio, dez grupos de vinte canais com 30 mm de comprimento e 3,3 mm de largura. As linhas desses canais são de 300 µm de espessura. Os canais, representados na Figura 4.5A, foram desenhados com referências que sinalizam troços de 1 cm e de 1,8 cm. Na Figura A2 do Anexo A encontra-se um canal nas mesmas condições dos apresentados neste estudo. Os canais foram impressos a cera difundiu no papel durante 2 minutos a 140 °C numa placa de aquecimento. Após este processo, a largura dos canais aproximou-se dos 3 mm.

Dois dos conjuntos de canais foram encapsulados com cera. O encapsulamento foi realizado através da impressão de uma camada de cera em ambas as faces dos canais criados. Num conjunto, o troço dos canais encapsulados foi 1 cm enquanto que no outro foi 1,8 cm. Em seis conjuntos de canais, para além do encapsulamento, os canais foram revestidos com as três

amostras de adesivo estudadas. A Figura 4.5 mostra os canais descritos. Na Figura A6 do Anexo A encontra-se um canal encapsulado a cera numa superfície.

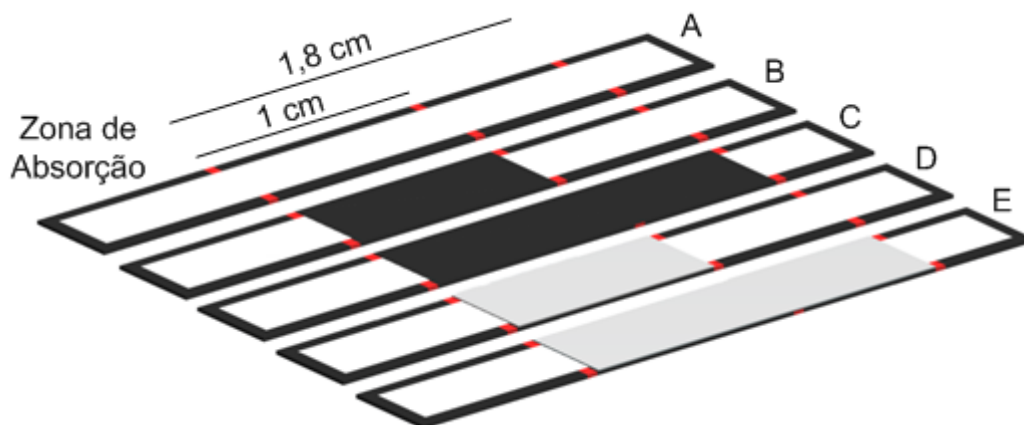


Figura 4.5: Conjunto de canais criados para o estudo da influência do encapsulamento no fluxo de fluidos: A) canais simples; B) Canais encapsulados em 1 cm do percurso; C) Canais encapsulados em 1,8 cm do percurso; D) Canais encapsulados e revestidos com adesivo em 1 cm do percurso; E) Canais encapsulados e revestidos com adesivo em 1,8 cm do percurso. Os canais foram criados em grupos de vinte.

Os canais foram suspensos sobre um recipiente com solução tamponada de fosfato (PBS do inglês *Phosphate Buffer Saline*), fornecido pelo INIAV, de maneira a que cerca de metade da zona de absorção inicial ficasse imersa na solução. Foram registados os tempos em que a solução percorreu as distâncias assinaladas. Os ensaios para canais de 1 cm foram realizados a uma temperatura de 23 °C e humidade relativa de 46%, ao passo que para os canais de 1,8 cm a temperatura foi de 23 °C e a humidade relativa de 52%.

4.2.2.2. Análise e discussão de resultados

Após recolha e tratamento de dados obteve-se o gráfico da Figura 4.6. Os tempos médios para o fluxo percorrer os canais simples (canais referência) foram de 63,5 s para o percurso de 1 cm e 148,6 s para 1,8 cm.

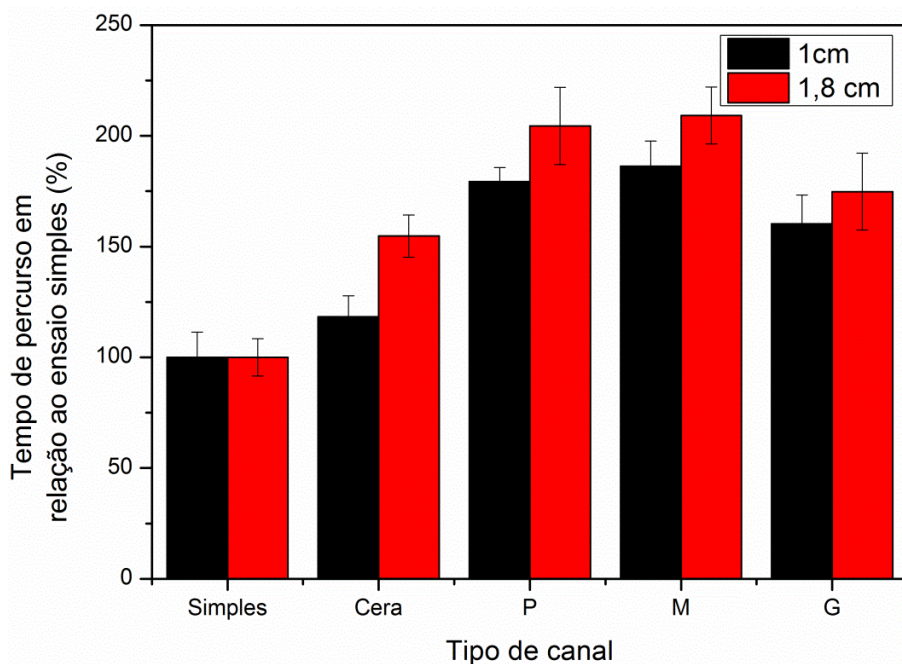


Figura 4.6: Relação entre o tempo de percurso da solução tamponada num canal simples e em canais com diferentes condições para distâncias de 1 cm e 1,8 cm: “Simples” refere-se aos canais não encapsulados, usados como referência; “Cera” refere-se aos canais encapsulados com cera; “P” refere-se a canais encapsulados com cera e adesivo P; “M” refere-se a canais encapsulados com cera e adesivo M; “G” refere-se a canais encapsulados com cera e adesivo G.

Como se pode ver no gráfico da Figura 4.6, os canais revestidos a cera provocam um acréscimo de 18% e 55% no tempo necessário ao fluido para percorrer os percursos de 1cm e 1,8cm, respetivamente. Esses acréscimos de tempo devem-se à limitação da zona hidrófila do papel pela cera depositada à superfície. É visível o aumento de volume da zona do canal onde o líquido está a fluir debaixo da cera depositada à superfície do papel.

Quando colocado adesivo de dupla face das amostras P e M os acréscimos de tempo situam-se na ordem dos 80% para canais de 1 cm e 100% para canais de 1,8 cm. As substâncias constituintes do adesivo não se encontram, na sua maioria, em contacto com o papel devido à camada de cera previamente depositada. Assim, a sua influência no procedimento é apenas de origem física, o que leva à conclusão que o comportamento físico, nomeadamente elástico, destas duas amostras é muito semelhante.

No caso do adesivo de dupla face G o tempo de percurso dos canais de 1 cm tem um acréscimo na ordem dos 60% enquanto que para canais de 1,8 cm esse acréscimo é da ordem dos 75%. Este facto permite concluir que esta amostra de adesivo de dupla face apresenta uma maior elasticidade, permitindo o aumento do volume do canal quando esta entra em contacto com o fluido que se pretende conduzir.

Os canais protegidos apenas com uma camada de cera nas duas superfícies livres apresentam os tempos de percurso mais baixos para os canais menores. Os canais de 1,8 cm encapsulados

apenas com cera demonstram alterações no fluxo do fluido da mesma ordem de grandeza dos canais com adesivo G nas suas superfícies.

As camadas de cera que se depositaram nas superfícies livres dos canais têm uma função protetora. O grupo *Whitesides* determinou a existência de cerca de 22 falhas por cm^2 quando se deposita uma camada de cera no papel [66]. Não é possível depositar mais do que uma camada de cera pois a primeira camada derrete à temperatura de impressão da cera. Isto faz com que essa primeira camada penetre no papel que forma o canal, algo que se pretende evitar.

Uma das vantagens do encapsulamento é minimizar o contacto do fluido a analisar com substâncias diferentes da cera. Apesar de aumentar o tempo de ensaio é uma opção a ter em conta. Outra solução será o encapsulamento com outra substância hidrófoba.

Na Figura 4.7 é possível ver falhas na camada de cera que impossibilitam o isolamento total da superfície de papel.

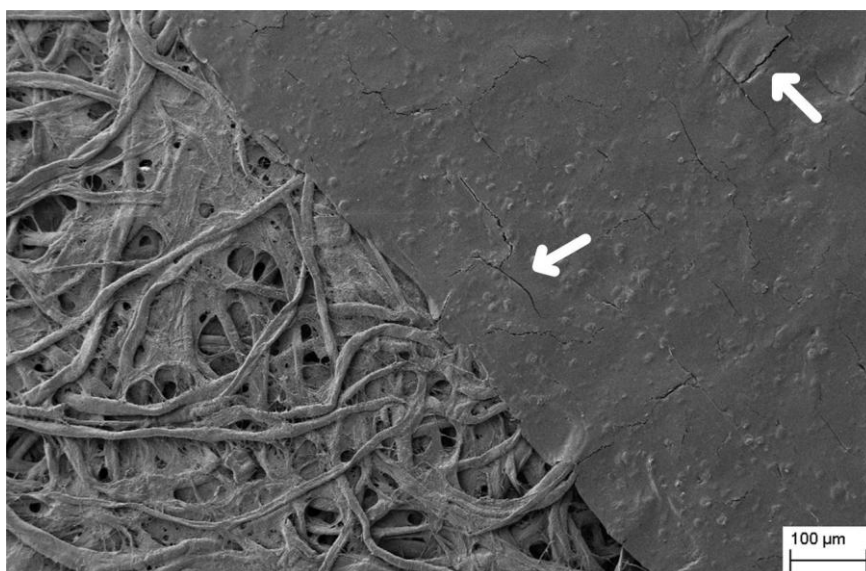


Figura 4.7: Imagem SEM do encapsulamento de canais no papel. As setas indicam falhas na camada de cera impressa no papel.

Na impressão de cera num acetato é possível ver uma camada de espessura de cerca de 15 μm , algo que não acontece no papel devido à estrutura da rede fibrosa e irregularidade da sua superfície.

O encapsulamento a cera dos canais de biossensores tem como vantagens não necessitar de equipamento, ou materiais diferentes dos utilizados para a construção dos canais e poder conter informação impressa.

4.3. Influência da orientação do substrato de papel no ensaio de microfluídica

O papel Whatman nº1 foi estudado como substrato para a fabricação de biossensores de papel. No processo de fabricação de papel existem processos mecânicos que podem influenciar a disposição das fibras de celulose na formação da sua rede tridimensional [14], [74]. Existe a hipótese de, durante estes processos, as fibras da malha de papel se orientarem numa direção preferencial. Este estudo procurou averiguar se a orientação do papel influencia o fluxo de um fluido por capilaridade na malha de papel.

4.3.1. Materiais e Procedimento experimental

Foram desenhados, no software Microsoft Visio, canais com 5 mm de largura e 50 mm de comprimento, com linhas de 500 µm de espessura. Os canais foram desenhados com referências que sinalizam troços com 5 mm de comprimento. A Figura 4.8 representa um dos canais. Na Figura A1 do Anexo A encontram-se canais nas mesmas condições dos apresentados neste estudo.

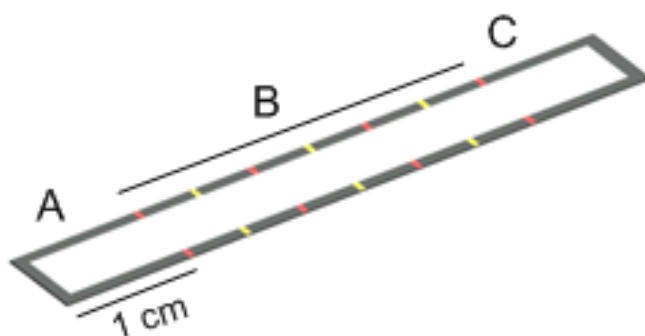


Figura 4.8: Canal desenhado para estudar a orientação das fibras do papel Whatman nº1: A) Zona de absorção inicial; B) Conjunto de zonas de análise limitadas por referências coloridas; C) Zona de absorção final

Foram impressos cinquenta canais na direção vertical e cinquenta canais na direção horizontal da folha de papel Whatman nº1. A Figura 4.9 indica as orientações estudadas em relação às folhas de papel Whatman nº1. Após impressos, os canais foram sujeitos a 140°C numa placa de aquecimento durante 2 minutos.

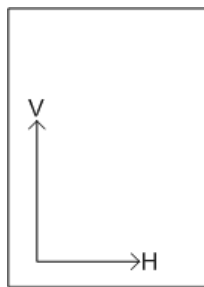


Figura 4.9: Representação das orientações vertical (V) e Horizontal (H) numa folha de papel de cromatografia Whatman nº1.

Foi preparada uma solução de 0,1% de cloreto de sódio ($\geq 99,5\%$) em água destilada (Millipore, Billerica, MA, USA). Os canais foram suspensos sobre um recipiente com a solução efetuada, de maneira a imergir metade da zona de absorção inicial. Com um cronómetro, foi registado o tempo em que a frente de onda da solução chegou a cada referência do canal, num total de cinquenta canais por direção. As condições ambiente (humidade relativa e temperatura), foram registadas.

4.3.2. Análise e discussão de resultados

O gráfico da

Figura 4.10 mostra a velocidade média do fluxo de solução 0,1% NaCl por troço do canal. Durante os ensaios verificou-se uma variação de temperatura entre $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ e de humidade relativa entre 28 % e 31 %.

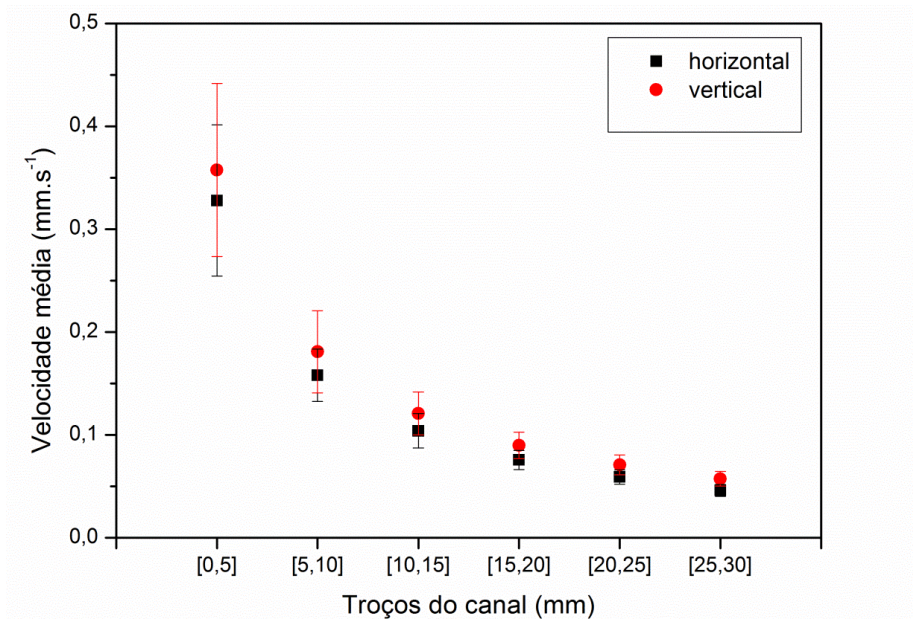


Figura 4.10: Velocidade média para cada intervalo de 5 mm do canal percorrido pela solução 0,1% NaCl.

Na figura anterior é clara a tendência para a diminuição da velocidade do fluxo de solução que percorre o canal à medida que a distância à fonte de fluido aumenta. Esta tendência verifica-se independentemente da direção em que os canais foram criados no papel. Apesar de semelhantes, há uma tendência que indica uma velocidade superior do fluxo na orientação vertical do papel em relação à orientação horizontal. Esta tendência acentua-se com o aumento da distância do fluxo à fonte de solução. Os dados analisados apontam para a existência de uma ténue preferência no que toca à orientação das fibras no papel Whatman nº1. É a disposição da rede fibrosa que possibilita a ação capilar e, portanto, o fluxo de um fluido no papel [14], [74]. A equação de Washburn, apresentada na secção 1.2, descreve o comportamento do fluxo de um fluido num meio poroso. Das suas grandezas tomam-se como constantes as inerentes ao líquido e ao papel. Assim:

$$d^2(t) = kt \quad \text{Eq. 4.1}$$

ou,

$$t = k^{-1}d^2(t) \quad \text{Eq. 4.2}$$

onde

$$k = \frac{\gamma D}{4\eta} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Através da equação 4.1 verifica-se que o quadrado da distância percorrida pelo líquido é proporcional ao tempo que o líquido leva a completar esse percurso. A equação 4.3 determina que a única grandeza que se altera ao modificar o sentido do fluxo de um líquido no papel é o diâmetro do poro. A

Figura 4.11 mostra a verificação da equação de Washburn para os resultados obtidos.

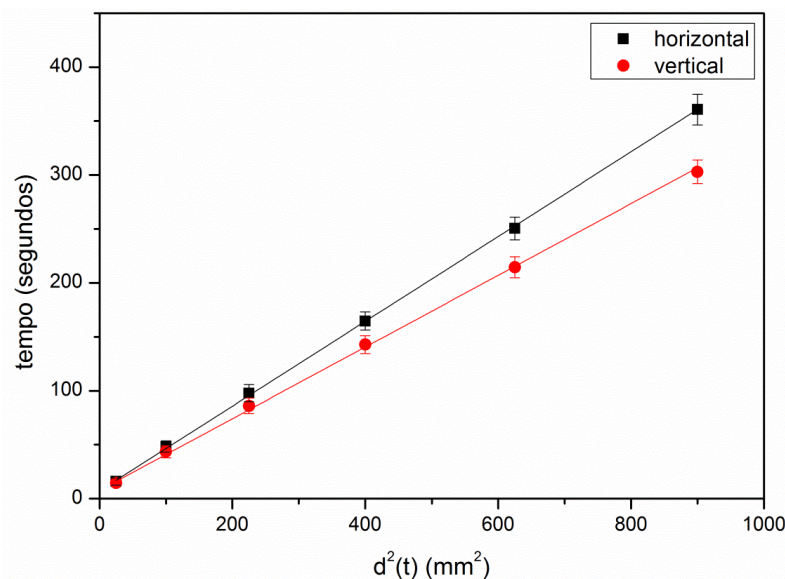


Figura 4.11: Tempo do fluxo de solução de 0,1% NaCl em função da distância percorrida (representada ao quadrado).

O gráfico da

Figura 4.11 reforça a tendência para uma maior velocidade de fluxo na orientação vertical do papel em relação à orientação horizontal, que se acentua com o aumento da distância percorrida. As regressões lineares dos resultados obtidos são:

$$t_h = 0,391 \times d^2(t) + 7,13 \quad \text{Eq. 4.4}$$

e

$$t_v = 0,327 \times d^2(t) + 7,63 \quad \text{Eq. 4.5}$$

com $R_h^2 = 0,99962$ e $R_v^2 = 0,99904$.

A equação de Washburn assume o movimento de soluções em tubos capilares de diâmetro regular. Apesar de ser útil para compreender o comportamento de um líquido num meio poroso apresenta limitações. Não é possível determinar o diâmetro médio dos poros de um sistema irregular como a malha fibrosa de papel [12]. Por outro lado, é possível uma comparação, através dos resultados obtidos, da porosidade induzida pela disposição das fibras de celulose na direção horizontal e vertical da folha de papel. Os declives das regressões lineares representadas na

Figura 4.11 variam apenas no parâmetro relacionado com o formato do poro (equação 5.3). Assim, conclui-se que a porosidade induzida pela disposição das fibras de papel favorece o fluxo de um líquido na orientação vertical da folha. A influência da porosidade na rede tridimensional do papel parece ganhar preponderância sobre a distância à fonte de líquido a partir dos 20 mm de distância. O facto das regressões lineares terem coordenadas na origem diferentes de zero deve-se ao percurso da solução desde a parte do canal imersa até ao

primeiro ponto referencial onde o tempo começou a ser registado. Esses valores são muito próximos para os dois casos, o que reforça a preponderância da proximidade da fonte de solução sobre a porosidade do meio para percursos curtos.

4.4. Influência da humidade relativa no ensaio de microfluídica em papel

O papel, componente principal dos biossensores estudados, é um material higroscópico [77]. Sendo um substrato que tende a absorver água do meio ambiente, é importante estudar a influência desse fenómeno para prever o comportamento de um biossensor de papel quando exposto a condições ambiente diferentes.

4.4.1. Materiais e Procedimento experimental

Foram criados grupos de vinte canais segundo o procedimento descrito na secção 4.2.2.1, representados na Figura 4.5A. Os canais foram suspensos sobre um recipiente com uma solução de PBS (fornecido pelo INIAV) de maneira a que a zona de absorção contactasse com o líquido. Os tempos necessários para que a solução percorresse as distâncias referenciadas nos canais foram registados com um cronómetro. Foram efetuadas vinte medidas para cada distância, sujeitas a humidades relativas diferentes.

4.4.2. Análise e discussão de resultados

A

Figura 4.12 mostra os resultados obtidos. A temperatura variou entre 22°C e 24°C durante os ensaios.

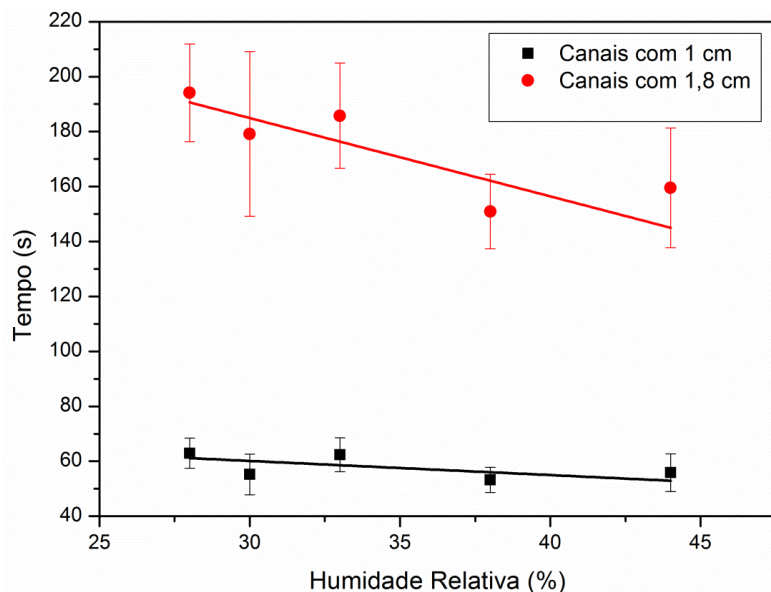


Figura 4.12: Gráfico do tempo de percurso da solução tamponada em função da humidade relativa. Para os canais com 1 cm a equação linear obtida foi $y = 75,55 - 0,51x$ com coeficiente $R^2 = 0,24$. No caso dos canais com 1,8 cm a equação da regressão linear obtida foi $y = 270,52 - 2,85x$ com $R^2 = 0,60$.

O gráfico da Figura 4.12 mostra a influência da humidade relativa no tempo necessário para o fluido percorrer o seu percurso. Para o percurso de 1,8 cm a humidade é mais preponderante, sendo que o declive da regressão linear obtida é de 2,85. Isto significa que 1% a mais de humidade, no intervalo apresentado, resulta num decréscimo de 2,85 segundos no tempo de fluxo. No primeiro centímetro de percurso o declive da regressão linear, que expressa a influência da humidade no tempo necessário para o fluido percorrer o seu percurso, é de 0,51. O facto de os tempos de percurso diminuírem com o aumento da humidade relativa é uma consequência da diminuição de evaporação do fluido [66]. A diferença entre os declives observados para os percursos de 1cm e 1,8 cm deve-se à maior exposição do fluido ao fenómeno de evaporação quando percorre o maior trajeto. A exposição do fluido à evaporação também é agravada pela diminuição da velocidade do seu fluxo devido ao aumento da distância à fonte, o que está de acordo com a equação de Washburn [12], [13], [78].

4.5. Interação entre papel e adesivo

O adesivo de dupla face é um dos constituintes de um biossensor 3D. Tem como objetivo permitir a sobreposição de camadas de papel. Pretende-se que funcione como limitador dos canais que fazem parte do percurso de um fluido no biossensor 3D. O adesivo, para além de possuir propriedades adesivas, é hidrófobo, o que o torna num material indicado para unir seletivamente camadas de papel e, assim, possibilitar a construção de um biossensor 3D.

Este estudo pretende analisar a influência do contacto do adesivo com os canais de papel, no fluxo de um fluido. É esperado que este contacto com o adesivo interfira com o fluxo de um fluido no papel não só devido à ação das substâncias que a constituem mas também devido ao isolamento em relação ao meio ambiente.

Para estudar a interferência que o adesivo tem na realização de um teste foram analisadas as seguintes variáveis: 1) número de lados em que um canal de papel está rodeado por adesivo; 2) comprimento do canal que se encontra em contacto com o adesivo; 3) tempo de armazenamento do canal com adesivo. Estas variáveis foram analisadas para três adesivos de dupla face diferentes.

4.5.1. Materiais e Procedimento experimental

Foram criados canais iguais aos efetuados na secção 4.2.2.1, apresentados na Figura 4.5A. Em conjuntos de vinte canais foram cobertas distâncias de 1 cm e 1,8 cm com três adesivos de dupla face diferentes: P, M e G. Essa cobertura ocorreu, para uns conjuntos, apenas numa das superfícies dos canais e, para outros, nas duas superfícies. Os canais cobertos foram divididos em grupos. Um grupo foi testado de imediato, outro esteve armazenado um dia no exsiccador e outro esteve armazenado uma semana no exsiccador. A Tabela 4.2 mostra o conjunto de ensaios e as variáveis envolvidas.

Tabela 4.2: Variáveis estudadas e número total de ensaios

Tipo de adesivo	Nº de superfícies cobertas	Distância coberta (cm)	Tempo de armazenamento	Total de ensaios (conjuntos de 20)
P	1	1	Não aplicável	720
M	2	1,8	Dia	
G			Semana	

Os canais foram percorridos por uma solução tamponada PBS (fornecido pelo INIAV). O tempo necessário para a solução percorrer as distâncias estabelecidas foi cronometrado. A temperatura e humidade relativa foram registadas. A Figura 4.13 mostra a montagem experimental para verificar o comportamento da solução em todos os canais criados, segundo as variáveis indicadas na Tabela 4.2.

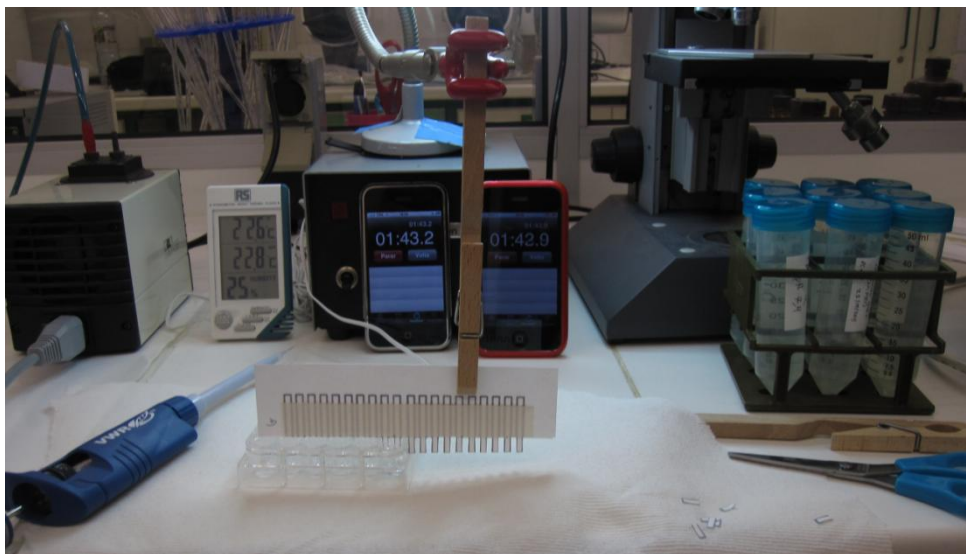


Figura 4.13: Montagem experimental para obter os dados necessários à análise das variáveis em estudo. A montagem é constituída por uma garra, uma mola, um recipiente com solução tamponada e o conjunto de canais. Utilizou-se um higrômetro para verificar as condições ambiente e um cronómetro para registar os tempos de fluxo da solução para as distâncias pretendidas. O nível de solução no recipiente foi mantido com recurso a uma pipeta 1:10 μL .

Os resultados da secção 4.4 foram obtidos nas mesmas condições dos resultados do presente estudo. Através das regressões lineares, obtidas para a influência da humidade relativa nos ensaios de microfluídica em papel, os dados deste estudo foram corrigidos para permitir a comparação.

4.5.2. Análise e discussão de resultados

Os resultados dos conjuntos de canais estudados estão na Figura 4.14. A figura mostra a média dos valores obtidos com os ensaios de microfluídica. As barras de erro representam o desvio padrão entre os ensaios.

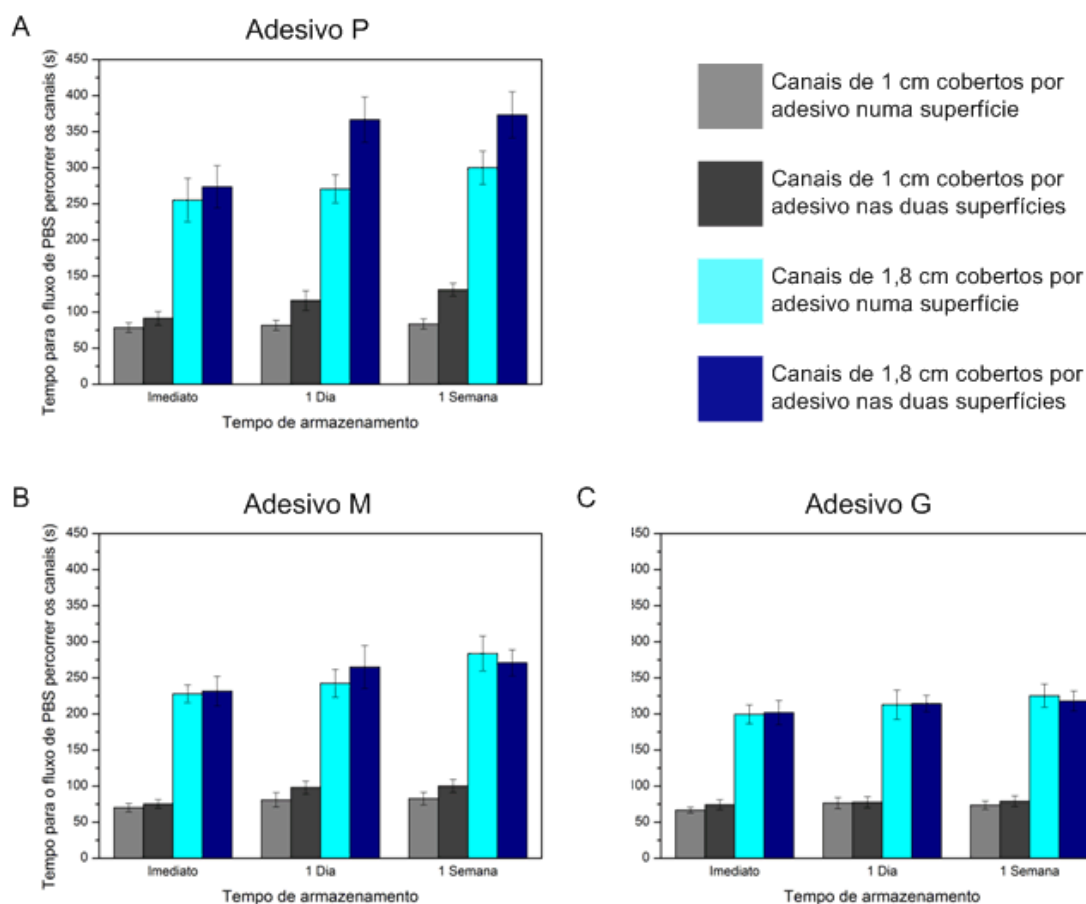


Figura 4.14: Tempo necessário para a solução tamponada percorrer canais em diferentes condições para: A) Adesivo P; B) Adesivo M; C) Adesivo G.

Como foi referido na secção 4.3.2, a distância percorrida por um fluido através de capilaridade é proporcional à raiz quadrada do tempo. A propriedade do substrato hidrófilo que influencia essa relação é a sua porosidade. Existem factores do meio, como a temperatura e a humidade relativa, que influenciam o comportamento do fluxo de uma solução mediante a ação capilar [66]. Na secção 4.4.2 verificou-se que a humidade relativa é um factor com maior influência quando o fluido percorre distâncias maiores.

A utilização de adesivo é fundamental para a montagem e consequente funcionamento de um biossensor 3D. Contudo, o adesivo, material hidrófobo segundo a secção 3.2.1, é constituído por substâncias que penetram as falhas de superfície dos materiais que aderem [42], [66], [79–81]. A porosidade superficial do papel é assim reduzida. Por outro lado, os adesivos ajudam no isolamento do canal em relação às condições ambientais.

A Figura 4.14A mostra os tempos de percurso da solução em função do tempo de armazenamento dos canais cobertos com adesivo P. Há uma tendência para o aumento do tempo de percurso com o aumento do tempo de armazenamento dos canais. Esta tendência é

mais acentuada para os canais cobertos nas duas superfícies. O maior incremento de tempo necessário para a solução percorrer as distâncias dos canais acontece para o tempo de armazenamento de um dia. Os canais cobertos por adesivo nas duas superfícies apresentam tempos maiores para um dia e uma semana de armazenamento. Nos ensaios efetuados de imediato, o número de lados não diferencia significativamente os resultados.

Na Figura 4.14B podem ver-se os tempos de percurso em função do armazenamento dos canais cobertos por adesivo M. Verifica-se uma tendência para o aumento do tempo de percurso com o aumento do tempo de armazenamento. O número de superfícies cobertas, neste caso, parece não influenciar significativamente os resultados.

No caso dos resultados obtidos para canais cobertos com adesivo G, Figura 4.14C, o tempo de armazenamento, assim como o número de lados, parecem não influenciar o tempo de percurso da solução nos canais.

Ao comparar os resultados dos três adesivos é notório que aquele que menos modifica a velocidade da solução em relação aos canais livres (estudados na secção 4.4.2) é o adesivo G. Este é também o adesivo mais estável ao longo do tempo. Estes resultados indicam o adesivo G como o menos intrusivo nos canais. O adesivo P é o que mais alterações provoca ao longo do tempo. É também o adesivo em que o número de lados que cobre num canal tem maior influência para a velocidade do fluxo de uma solução. Estes dados apontam o adesivo P como o mais intrusivo nos canais. O adesivo M apresenta resultados intermédios. Se considerarmos distâncias menores é irrelevante a utilização do adesivo M ou do adesivo G. Para distâncias maiores (1,8 cm) o adesivo G apresenta-se como a melhor solução para a construção de um biossensor 3D.

4.6. Interação entre papel e pó de celulose

4.6.1. Quantidade de pó de celulose

A ligação em pontos específicos de diferentes camadas de papel é fundamental para o funcionamento de biossensores 3D. Esses pontos são formados por orifícios na camada de adesivo colocada entre camadas de papel. Devido à espessura da camada de adesivo é preciso averiguar se ocorre o fluxo de um fluido de uma camada de papel para outra, na ausência de um material que assegure essa ligação. Este estudo procurou determinar se é necessária a utilização de pó de celulose para assegurar a ligação de camadas de papel. No caso de ser necessário, pretendeu-se inferir quanto à quantidade desse material que otimiza o fluxo de um fluido entre camadas de papel [1].

4.6.1.1. Materiais e Procedimento experimental

Foi desenhado, no software Microsoft Visio, um sistema constituído por duas camadas de papel unidas por uma camada de adesivo, como se ilustra na Figura 4.15A. Um exemplo dos canais utilizados no sistema referido encontra-se na Figura A7 do Anexo A. O desenho foi impresso na impressora de cera e sujeito a 140 °C durante 2 minutos numa placa de aquecimento. A camada de adesivo (representada a amarelo na Figura 4.15) foi padronizada criando orifícios representados pelas circunferências a preto na Figura 4.15A com recurso à energia solar, através da utilização de uma lupa³. Tendo em conta os resultados obtidos no estudo da secção 4.5, utilizou-se o adesivo G. A montagem do sistema está esquematizada na Figura 4.15B. Após montado sem a utilização de pó de celulose, o sistema foi suspenso sobre um recipiente com uma solução de PBS (fornecido pelo INIAV). O número de ensaios em que se verificou um fluxo intercamadas foi registado.

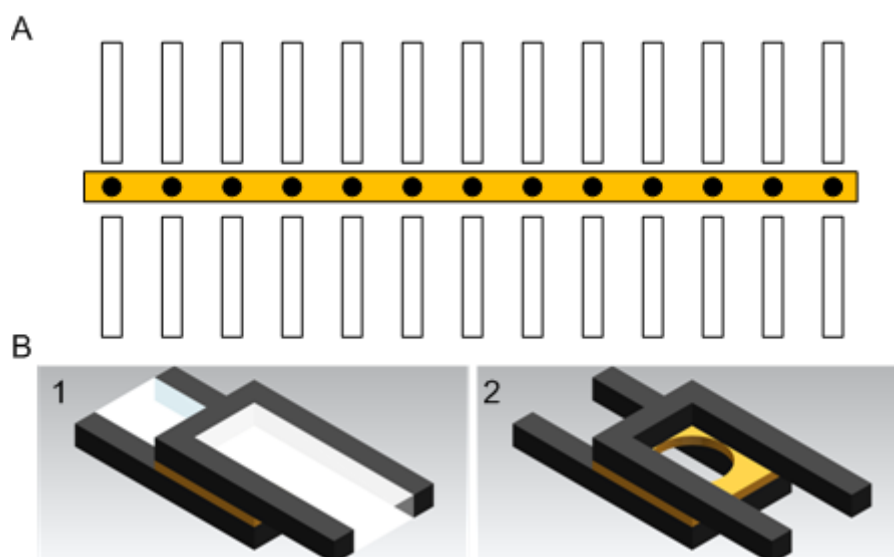


Figura 4.15: A) Desenho do sistema elaborado no software Microsoft Visio. É formado por dois conjuntos de 20 canais com 3,3 x 30 mm² com linhas de 300 µm de espessura e por uma camada com o propósito de criar orifícios no adesivo. A cor amarela não corresponde à realidade, sendo um auxílio de interpretação; B1) Sistema montado após o processo de aquecimento das camadas de papel impressas e customização da camada de adesivo; B2) Zonas hidrófobas de b1: zonas do papel onde a cera se difundiu e camada de adesivo trabalhada de maneira a possibilitar o contacto entre as camadas de papel numa área específica.

Com o objetivo de determinar a relação massa/volume dos espaços entre camadas de papel a serem preenchidos por pó de celulose, foram criados tubos de papel com cera difundida com 3 mm de diâmetro. Os tubos foram desenhados em dois grupos de cinco, sendo um grupo com 5

³ Este método de padronização do adesivo foi utilizado numa fase do trabalho em que a máquina de corte a laser ainda não estava disponível.

mm de altura e outro grupo com 2,5 mm. Os tubos foram preenchidos com pó de celulose. O pó de celulose foi pressionado de maneira a ocupar o máximo de volume possível. A massa de pó em cada tubo foi pesada. Os tubos foram acoplados a uma base de papel em contacto com uma solução simples de corante alimentar azul (Globo), de acordo com a Figura 4.16. Observou-se o percurso da solução até ao topo dos tubos.

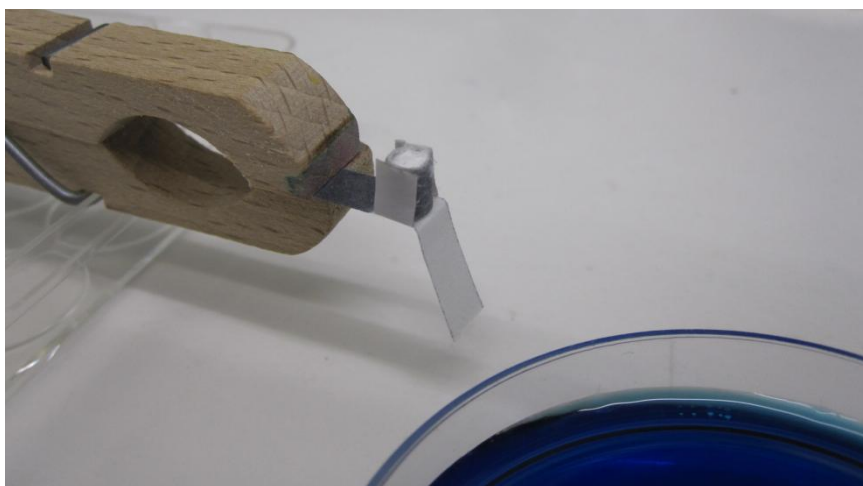


Figura 4.16: Fotografia da montagem dos tubos com pó de celulose para verificar o seu funcionamento bem como para relacionar o volume de canal com a quantidade de pó de celulose necessária para se estabelecer contacto entre camadas de papel. Foram construídos tubos com 2,5 mm e 5 mm de altura com 3 mm de diâmetro. Os tubos foram colados a uma base de papel e suspensos com o recurso a uma mola.

Após medição da espessura da camada de adesivo, tornou-se possível determinar uma massa de pó de celulose para preencher os espaços criados entre camadas de papel pela camada de adesivo. Foram também testadas metade e o dobro da massa calculada. Os canais de teste foram montados segundo a Figura 4.15. O procedimento e condições foram os mesmos efetuados para a averiguação da necessidade de pó de celulose nos canais. Cronometrou-se o tempo desde que a solução de PBS (fornecido pelo INIAV) entrou em contacto com a camada de adesivo até a sua frente de onda o deixar de fazer, na segunda camada de papel.

4.6.1.2. Análise e discussão de resultados

Num quarto dos testes realizados sem a inclusão de pó de celulose na sua montagem a solução não transitou entre camadas, provando-se assim a necessidade de um agente que assegure a ligação entre estas.

Na Tabela 4.3 podem consultar-se os valores médios das massas de pó de celulose que preenchem os canais cilíndricos criados. Através destes dados construiu-se o gráfico da Figura 4.17. Este gráfico representa a relação entre o volume de canal e massa de pó de celulose.

Tabela 4.3: Valores médios das massas de pó de celulose que preenchem canais cilíndricos de 2,5 e 5 mm.

Tipo de canais	Cilindros com 2,5 mm de altura (mg)	Cilindros com 5 mm de altura (mg)
Média	16,7	35,2
Desvio Padrão	1,2	2,6

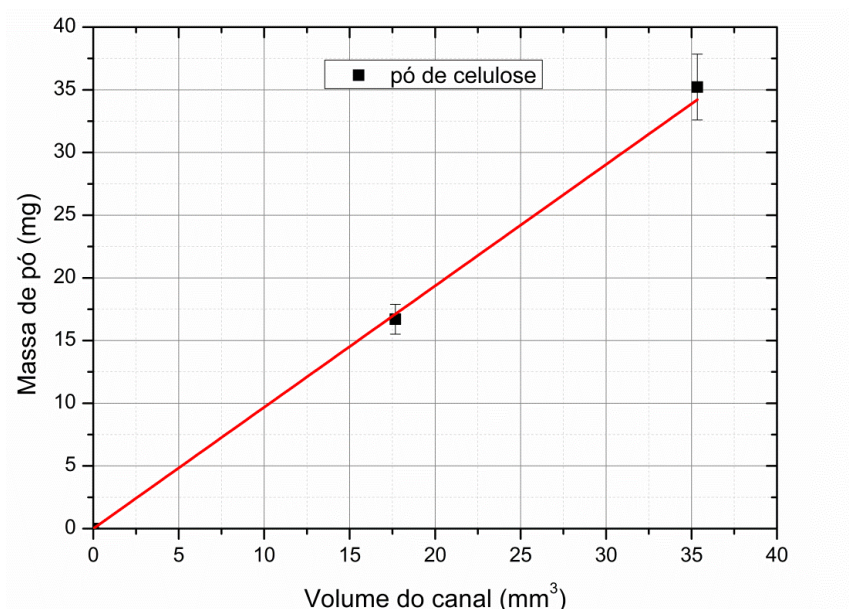


Figura 4.17: Massa de pó de celulose necessária para preencher canais cilíndricos com diferentes volumes. A regressão linear obtida é $y = 0,968x$ Com um $R^2=0,9986$.

Ao analisar-se o gráfico da Figura 4.17 verifica-se uma relação de cerca de 1 mg de pó de celulose para um volume de 1 mm^3 . A partir da equação da sua regressão linear é possível estimar a quantidade de pó de celulose necessária para um espaço criado pela espessura de uma camada de adesivo. A distância que o adesivo G provoca entre camadas de papel é de cerca de $64 \mu\text{m}$. Como os buracos induzidos na camada de adesivo são circulares, com 3 mm de diâmetro, o volume do cilindro criado é de $0,4524 \text{ mm}^3$. Segundo o gráfico da Figura 4.17, o volume obtido será preenchido por cerca de 0,4524 mg. Como a balança utilizada tem uma sensibilidade de 0,1 mg utilizou-se aproximadamente 0,4 mg por canal cilíndrico.

A altura dos espaços cilíndricos, criados pela espessura dos adesivos, é muito menor que a altura dos canais cilíndricos utilizados para determinar a quantidade de pó de celulose necessária por volume. Assim foram testados ensaios não só para a massa determinada como também para o dobro e metade desta. Os resultados dos grupos de 20 ensaios, para massas de 0,2 mg, 0,4 mg e 0,8 mg estão representados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Tempo de percurso da solução tamponada para canais entre camadas de papel diferentes constituídos por várias quantidades de pó de celulose.

Massa de pó de celulose testada	0,2 mg (s)	0,4 mg (s)	0,8 mg (s)
Média	108,75	140,3	136,25
Desvio Padrão	17,03	17,98	15,6

Na tabela anterior verifica-se que os tempos registados para o fluxo da solução em canais ligados por massas de 0,4 mg e 0,8 mg são semelhantes. Os canais ligados por 0,2 mg permitiram um fluxo de maior velocidade. Os valores para as massas calculadas estão próximos dos limites de deteção da balança utilizada, o que justifica desvios padrão elevados.

4.6.2. Comparação da libertação de proteína BSA entre papel Whatman nº1 e pó de celulose

Foi estudada a hipótese do pó de celulose não servir apenas como ponte entre camadas de papel num biossensor 3D, mas também como parte activa em todo o ensaio. Os biossensores podem conter zonas de conjugação onde substâncias alocadas reagem ou são arrastadas pela solução a analisar [28], [49]. Este estudo pretendeu comparar a capacidade do pó de celulose de libertar proteínas em relação ao papel aquando da passagem de um fluido. A proteína utilizada para a comparação foi a BSA por não fazer ligações específicas ao papel, ligar-se de forma estável a corantes (em meio ácido) e apresentar um baixo custo [36], [50].

4.6.2.1. Materiais e Procedimento experimental

Foram preparadas nove soluções de BSA (fornecido pelo INIAV) com concentrações de 0,1 µg/µL até 0,9 µg/µL com incrementos de 0,1 µg/µL a partir de uma solução de 1 µg/µL de BSA. A matriz representada na Figura 4.18 foi impressa a cera e sujeita a 140 °C durante 2 minutos. Na Figura A9 do Anexo A encontra-se uma réplica desta matriz.

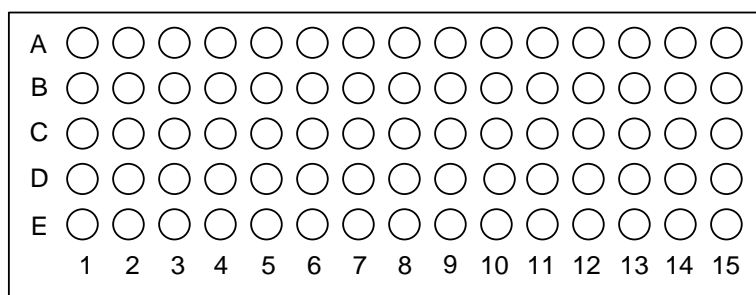


Figura 4.18: Matriz desenhada no software Microsoft Visio com 5x15 poços com diâmetro de 5 mm e linhas de 300 µm de espessura. A matriz foi impressa a cera e sujeita a 120 °C durante 2 minutos.

As soluções preparadas foram depositadas, em volumes de 3 μ L, nos poços da matriz. A quantidade correspondente de BSA nos poços está indicada na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Quantidade de BSA nos poços de cada coluna da matriz

Colunas da Matriz	Quantidade de proteína BSA nos poços da coluna (μg)
1	0,3
2	0,6
3	0,9
4	1,2
5	1,5
6	1,8
7	2,1
8	2,4
9	2,7
10	3
11	3,3
12	3,6
13	3,9
14	4,2
15	4,5

Após secagem dos poços da matriz foi efetuada a coloração com o método Coomassie Brilliant Blue. Este método é vulgarmente utilizado para a coloração e quantificação de proteínas [82], [83]. Utilizou-se uma solução de 0,25 g de Coomassie Brilliant Blue R-250, adquirido na Sigma-Aldrich Co. (Spruce Street, St. Louis, MO, USA), diluídos em 56,25 mL de metanol ($\geq 99,9\%$), 56,25 mL de água destilada (Millipore, Billerica, MA, USA) e 12,5 mL de ácido acético glacial (99-100%, Merck, Darmstadt, Germany). A solução foi colocada junto com a matriz, representada na Figura 4.18, numa tina de vidro. A tina foi sujeita a agitação suave durante 20 minutos. A matriz foi retirada e colocada noutra tina com 40 mL de solução de lavagem. Essa solução foi feita num volume de 240 mL composto por 50% de água desmineralizada, 40% de metanol e 10% de ácido acético. A tina foi agitada até a solução, previamente incolor, adquirir uma cor azul de intensidade constante. Em seguida o volume foi substituído por mais 40 mL de solução, repetindo todo o processo até se acabar a solução. Terminado o processo de lavagem, a matriz foi retirada da tina e secou às condições ambiente durante 3 horas [83], [84]. A matriz

foi digitalizada através de um scanner de maneira a obter uma calibração entre quantidade de proteína e intensidade de cor.

Com a calibração efetuada avançou-se para a comparação do pó de celulose com o papel como agente libertador de proteína durante um ensaio de microfluídica em papel.

Foram desenhados, no software Microsoft Visio, 40 canais com 3,3 mm de largura, 50 mm de comprimento e espessura de linha de 300 μm . Os canais foram impressos em papel Whatman nº1 utilizando a impressora a cera. Foram sujeitos a uma temperatura de 140 °C durante 2 minutos numa placa de aquecimento para ocorrer a difusão da cera no papel. O desenho dos canais está representado na Figura 4.19. Na Figura A8 do Anexo A encontra-se um canal nas mesmas condições dos apresentados neste estudo. Em dois conjuntos de 10 canais, foi efetuada a técnica do interruptor⁴ de maneira a garantir que 3 μL da solução 0,1 BSA fossem depositados na área destinada [30]. Os 10 canais foram colocados no frigorífico durante 12 horas a 4 °C.

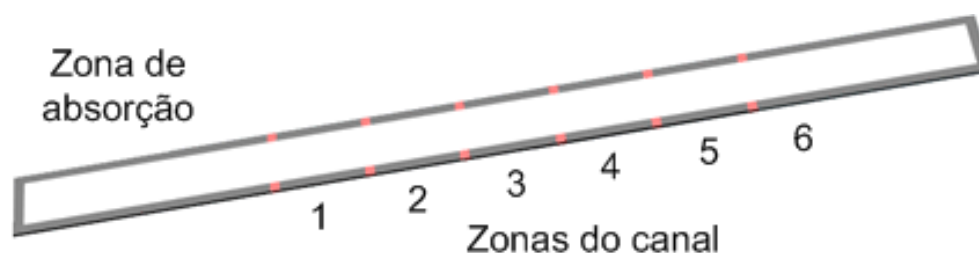


Figura 4.19: Canal utilizado para o estudo de libertação de proteínas. Possui uma zona de absorção que entra em contacto com a solução que vai percorrer o canal e tem seis zonas de análise.

Para estudar a hipótese do pó de celulose como libertador de proteína para os canais foi desenhada, recorrendo ao software Adobe Illustrator, uma peça suporte. A peça foi materializada em acrílico transparente com 3 mm de espessura (Dagol, Lisboa, Portugal), através da máquina de corte a laser. O objetivo da peça é assegurar a colocação precisa de pó de celulose com proteína BSA bem como assegurar a ligação dos canais. A peça suporte está representada na Figura 4.20.

⁴ Técnica descrita por *Li et al.* que consiste na interrupção do fluxo de uma solução aquosa através de um corte transversal ao canal. O fluxo é retomado quando as extremidades do canal, criadas pelo corte, voltam a entrar em contacto. Desta maneira é possível depositar um volume de solução numa área específica de um canal de papel sem ocorrer uma difusão da solução para áreas não desejadas.

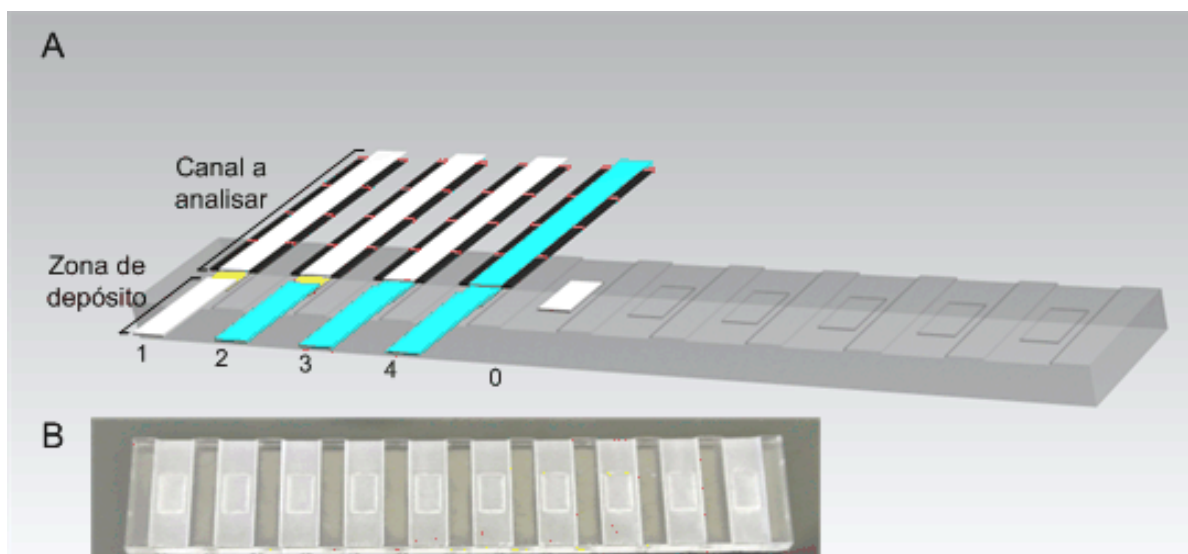


Figura 4.20: A) Esquema do ensaio para analisar a presença de proteínas nos canais em que a fonte é pó de celulose; A.0) poço preenchido com pó de celulose; A.1) Poço com pó e proteína BSA (representado a amarelo), zona de depósito e canal a analisar antes do ensaio; A.2) Zona de depósito com solução tamponada (representada a azul); A.3) transição da solução da zona de depósito para o poço com pó e proteína BSA; A.4) Transição da solução do poço para o canal a analisar; B) Foto da peça suporte utilizada para o estudo. A peça de acrílico foi desenhada no software Adobe Illustrator e cortada no laser.

Os poços da peça foram preenchidos com 2,54 mg de pó de celulose. A quantidade justifica-se com o estudo apresentado na seção 4.6.1. Em seguida foram colocados 3 μ L de solução 0,1% BSA em cada poço e a peça foi colocada no frigorífico, a 4 °C, durante 12 horas.

Os canais em que a fonte de proteína é o papel foram reativados (fechando os interruptores). Os canais em que a fonte de proteína é o pó de celulose foram montados com o recurso à peça suporte, segundo o esquema da Figura 4.20. Foram depositados 25 μ L de PBS em três vezes na zona de depósito de cada canal: 10 μ L com um intervalo de tempo de 2 minutos, 10 μ L com o mesmo tempo de espera e 5 μ L com um tempo de espera de 5 minutos. Verificou-se que o PBS percorreu os canais na totalidade. Deixou-se secar os canais durante 2 horas às condições ambiente e, após esse período, os canais foram sujeitos ao mesmo método de coloração usado para a reta de calibração. Foram obtidas digitalizações de todos os canais através de um scanner. Essas imagens foram analisadas tendo em conta a sua informação RGB através do software ImageJ.

4.6.2.2. Análise e discussão de resultados

A digitalização da matriz de poços está representada na Figura 4.21.

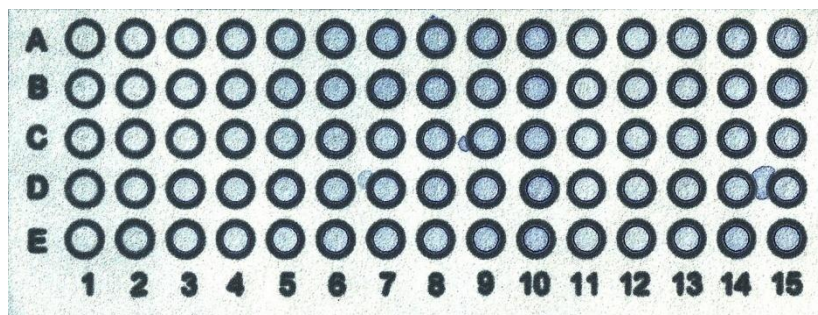


Figura 4.21: Matriz de 5x15 poços com soluções de concentrações crescentes no sentido da numeração de proteína BSA corada com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Ao observar a matriz nota-se uma tendência de intensificação de cor até aos poços da coluna número dez. A partir dessa coluna não se verifica qualquer tendência, o que se justifica pelo facto dos poços pertencentes às colunas com numeração maior que dez terem sido pipetados por duas vezes. A solução depositada na segunda vez arrastou as proteínas depositadas pela primeira para perto dos limites do poço. Desta maneira só foram considerados os resultados das primeiras dez colunas.

O gráfico da Figura 4.22 mostra a calibração realizada através da análise RGB da digitalização obtida para a matriz.

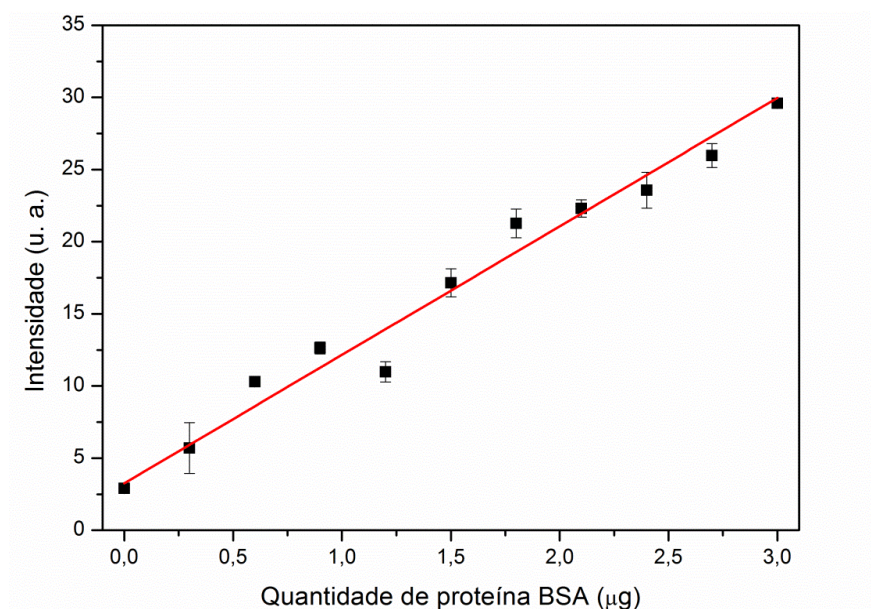


Figura 4.22: Diferença de intensidade RGB em relação ao branco em função da quantidade de proteína BSA presente no papel. A regressão linear obtida é $y = 8,90305x + 3,25284$ com $R^2 = 0,98894$.

No gráfico da Figura 4.22 verifica-se uma relação linear entre a quantidade de proteína BSA corada e a intensidade RGB da sua digitalização. A intensidade RGB representada corresponde

à diferença dos valores obtidos em relação ao branco. O aumento da quantidade de proteína BSA no papel aumenta a intensidade da cor azul do corante Coomassie Brilliant Blue. Na ausência de proteína a intensidade RGB é diferente de zero porque o papel Whatman nº1 não liberta, na totalidade, o corante Coomassie Brilliant Blue após as lavagens executadas.

A Figura 4.23 mostra as digitalizações dos canais realizados para a comparação do papel e pó de celulose enquanto libertadores de proteína BSA.

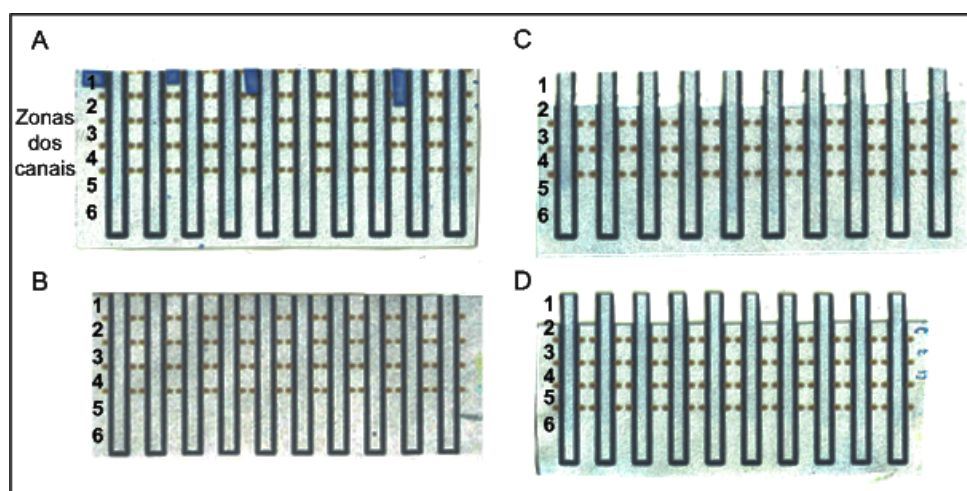


Figura 4.23: Canais percorridos por solução tamponada: A) e B) canais que tiveram como fonte de proteína papel Whatman nº1. As manchas de azul intenso da figura “A” são uma consequência da utilização de adesivo para a execução do ensaio; C) e D) Canais que tiveram como fonte de proteína o pó de celulose. A numeração indica os troços de 5 mm analisados.

As áreas dos canais da Figura 4.23 foram separadas em troços de 5 mm e analisadas com o software ImageJ. Os resultados para os canais em que a fonte de proteína é o próprio papel Whatman estão representados na Figura 4.24.

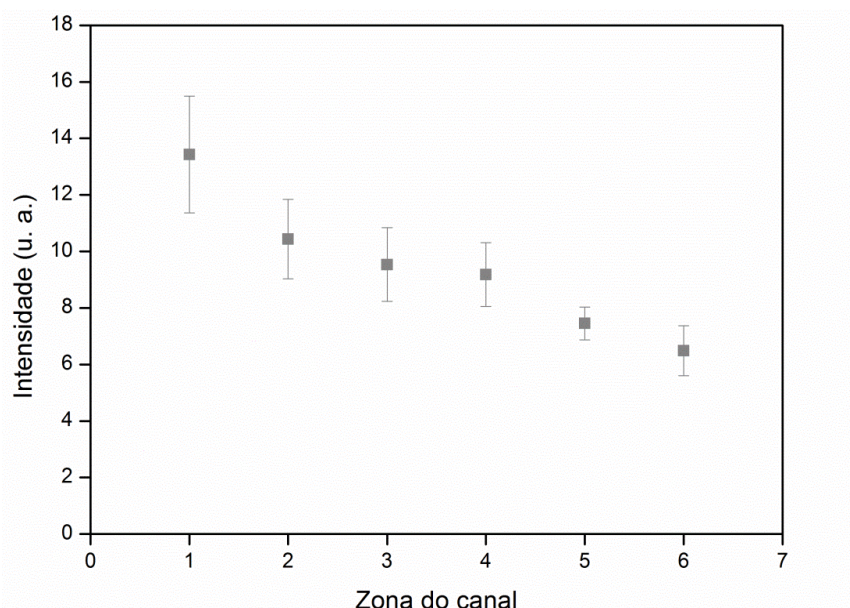


Figura 4.24: Diferença da intensidade RGB das imagens dos canais, cuja fonte de proteína é papel Whatman nº1, em relação ao branco absoluto em função das diferentes zonas do canal.

É clara a diminuição da intensidade da cor à medida que a distância dos troços em relação à fonte de proteína aumenta. Esta tendência significa que as proteínas têm limitações de mobilidade e a sua maioria é distribuída por distâncias perto da fonte. Os dados podem também indicar que a solução que percorreu os canais não foi suficiente para arrastar a totalidade da proteína depositada na fonte. A Tabela 4.6 indica as quantidades de proteína correspondentes às intensidades de cor obtidas segundo a calibração efetuada.

Tabela 4.6: Quantidade de proteína presente nos troços dos canais de papel, segundo a calibração previamente obtida. A fonte de proteína é o próprio papel.

Zona	Quantidade média de proteína BSA (μg)	Desvio Padrão da quantidade média de proteína BSA (μg)
1	1,14	0,23
2	0,81	0,16
3	0,71	0,15
4	0,67	0,13
5	0,47	0,06
6	0,36	0,1
Total	4,16	0,83

Segundo a calibração obtida, a quantidade média de proteína libertada da fonte para os canais é de $4,16 \mu\text{g} \pm 0,83 \mu\text{g}$. Algo que não é possível já que só foi depositada $3 \mu\text{g}$ de proteína na fonte do canal. O excesso justifica-se com a ligação do corante a outras substâncias que se encontram no papel. Da quantidade libertada é importante salientar que perto de metade fica no primeiro centímetro do canal percorrido pelo fluido.

O gráfico da Figura 4.25 diz respeito à movimentação da proteína BSA que foi depositada no pó de celulose.

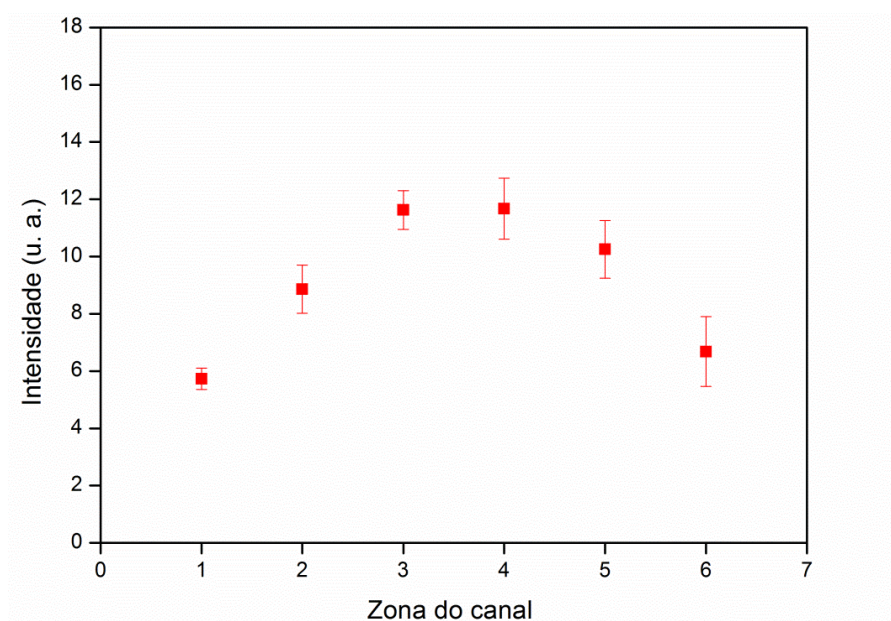


Figura 4.25: Diferença de intensidade RGB, em relação ao branco, em função das zonas do canal.

No caso do pó de celulose, enquanto fonte de proteína, não se verifica um comportamento linear entre a intensidade de cor e as zonas dos canais, segundo as suas distâncias à fonte. Neste ensaio há uma maior intensidade de cor nas zonas situadas a meio do canal. A intensidade é menor na zona imediatamente a seguir à fonte e na mais afastada. As quantidades de proteína BSA correspondentes às intensidades obtidas podem ser consultadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Quantidade de proteína presente nos troços dos canais de papel, segundo a calibração previamente obtida. A fonte de proteína é o pó de celulose.

Zona	Quantidade média de proteína BSA (μg)	Desvio Padrão da quantidade média de proteína BSA (μg)
1	0,29	0,04
2	0,63	0,09
3	0,94	0,08
4	0,95	0,12
5	0,79	0,11
6	0,39	0,14
Total	3,99	0,69

A quantidade média de proteína libertada da fonte para os canais é de $3,99 \mu\text{g} \pm 0,69 \mu\text{g}$. É sensivelmente a mesma porção libertada pela fonte de papel. Tal como ocorrido no ensaio em que a fonte de proteína foi o papel, a quantidade de proteína libertada é superior à depositada na fonte. Uma vez mais, tal justifica-se com ligações do corante a outras substâncias. Ainda

assim, verifica-se que a maior parte da proteína libertada situa-se nos troços intermédios dos canais.

A Figura 4.26 compara os resultados obtidos nos dois casos estudados.

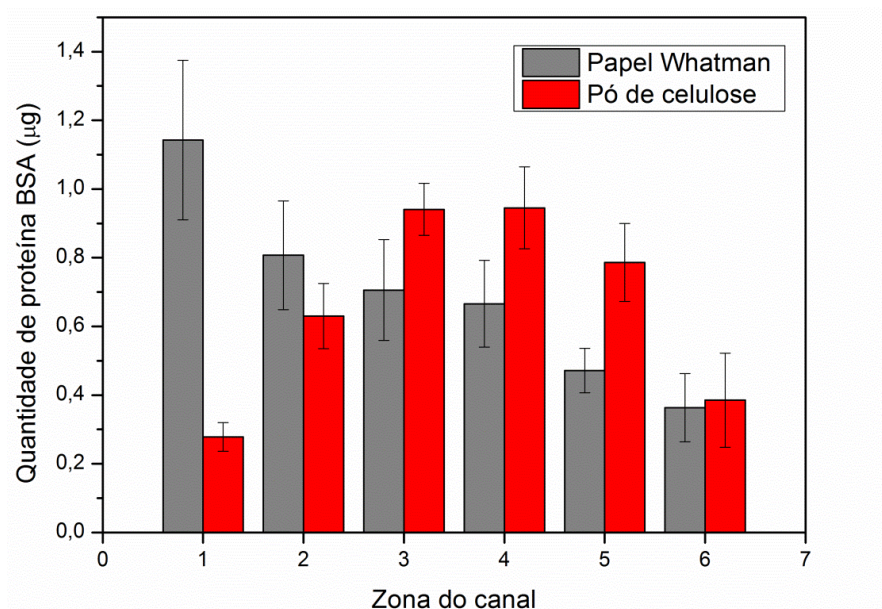


Figura 4.26: Quantidade de proteína BSA estimada para cada zona dos canais para fontes de papel e pó de celulose.

As quantidades totais libertadas entre o papel Whatman nº1 e o pó de celulose são semelhantes. Verificou-se que o estudo aponta para uma quantidade de proteína identificada maior que a depositada, pelo que não se pode concluir quanto a valores absolutos no que diz respeito às quantidades libertadas pelos diferentes meios. Por outro lado, os dados obtidos permitem uma comparação entre o papel e o pó de celulose enquanto libertadores de proteína BSA. A grande diferença entre o papel e o pó de celulose é mesmo a localização da maioria da proteína libertada. Segundo a Figura 4.26, o papel Whatman libertou mais proteína para as duas primeiras zonas dos canais, ou seja, no primeiro centímetro. O pó de celulose libertou mais proteína nas zonas 3, 4 e 5, ou seja, do primeiro ao terceiro centímetros dos canais.

5. Aplicação – Detecção e quantificação de glucose

5.1. Otimização de biossensores de formato 3D para a quantificação de glucose

No presente estudo foram desenvolvidos biossensores 3D para a quantificação de glucose, tendo como objetivo: 1) testar uma aplicação de biossensores 3D, 2) verificar o seu funcionamento para a quantificação de glucose e 3) melhorar a homogeneidade da coloração na zona de detecção em relação aos biossensores de papel de fluxo lateral.

Este estudo teve como referência o trabalho desenvolvido por *Dungchai* e *Martinez*, bem como os resultados obtidos previamente pelo nosso grupo de investigação [34], [40], [44], [51]. Na tese de dissertação elaborada por *Mafalda N. Costa*, foram testados biossensores de fluxo lateral para a detecção de glucose, sendo que os resultados foram influenciados pela direção do fluxo de solução devido ao arrastar de substâncias provocado pelo fluxo lateral no papel [40]. Os biossensores com formato 3D permitem o fluxo vertical de soluções, o que pode resolver a heterogeneidade verificada nas zonas de detecção dos formatos 2D.

5.1.1. Materiais e Procedimento experimental

Os biossensores 3D, para a detecção de glucose, foram construídos e montados segundo os esquemas da Figura 5.1 e Figura 5.2, respetivamente. Os padrões das imagens A e B da Figura 5.1 foram desenhados de forma a minimizar o volume de líquido necessário para a realização de um teste, contudo, o desenho do padrão encontra-se limitado por factores como o manuseamento e a facilidade com que se observa o resultado. Estes padrões foram impressos na impressora a cera (tinta sólida) e sujeitos a uma temperatura de 120 °C durante 1 minuto, recorrendo à placa de aquecimento da Figura 5.1. Na Figura A10 do Anexo A encontram-se camadas de papel idênticas às utilizadas na construção do biossensor 3D para detecção e quantificação de glucose.

O padrão da imagem da Figura 5.1C foi utilizado para criar orifícios no adesivo de dupla face através de uma máquina de corte a laser. O adesivo utilizado foi o “Adesivo M” estudado na secção 4.5. A escolha do adesivo para este dispositivo não é determinante para os resultados uma vez que a influência deste, no fluxo vertical, é mínima. Os testes foram executados imediatamente após a montagem dos biossensores o que, segundo o estudo apresentado na secção 4.5, diminui a influência do tipo de adesivo no fluxo de soluções.

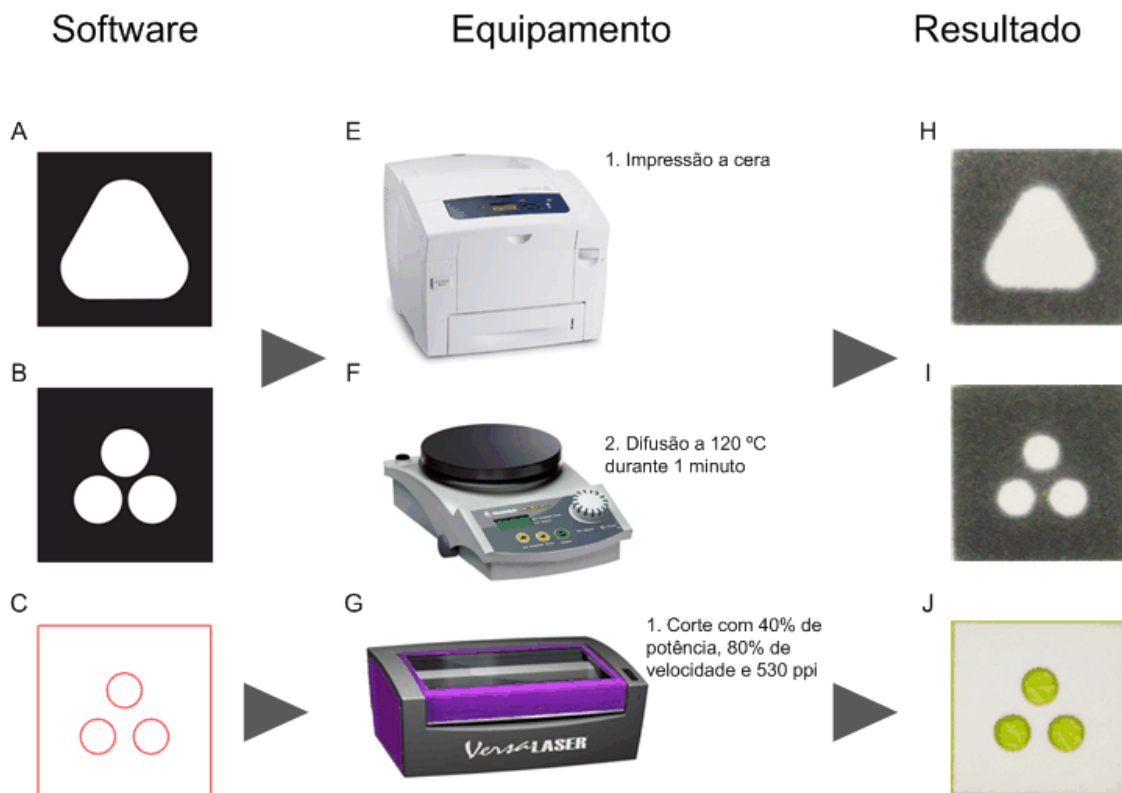


Figura 5.1: Esquema de procedimento para a criação das camadas constituintes de um biossensor 3D. A coluna das imagens A, B e C diz respeito ao desenho dos padrões pretendidos recorrendo ao software Adobe Illustrator: A) padrão da 1ª camada de papel - zona de depósito; B) padrão da 2ª e 3ª camada de papel – canal e zona de deteção; C) padrão da 1ª e 2ª camada de adesivo de dupla face. A coluna das imagens E, F e G diz respeito ao equipamento e parâmetros de utilização: E) Impressora de tinta sólida Xerox ColorQube 8570; F) Placa de aquecimento Heidolph MR-Hei-Tec; G) Laser Universal VLS 3.50. Na última coluna, formada por as imagens H, I e J, são apresentadas as fotos das camadas finalizadas: H) foto da 1ª camada de papel - zona de depósito; I) foto da 2ª e 3ª camada de papel – canal e zona de deteção; J) foto da 1ª e 2ª camada de adesivo de dupla face. As camadas representadas nas imagens H, I e J são quadrados com 1,6 cm de lado.

A montagem dos biossensores consiste na adesão de camadas de papel através de um adesivo. É colocado pó de celulose nos poços criados no adesivo para assegurar um contacto hidrófilo entre as camadas de papel. Numa primeira instância foi testado um formato com apenas duas camadas de papel, zona de depósito e zona de deteção, unidas por uma camada de adesivo. Utilizou-se uma solução de corante alimentar (Globo) para verificar o funcionamento dos canais. Devido à proximidade entre as camadas de papel (separadas apenas por uma camada de adesivo), verificou-se um fenómeno de refluxo do fluido a analisar que pode provocar um contacto não desejado entre substâncias destinadas a diferentes análises, que poderá pôr em causa a fiabilidade dos testes.

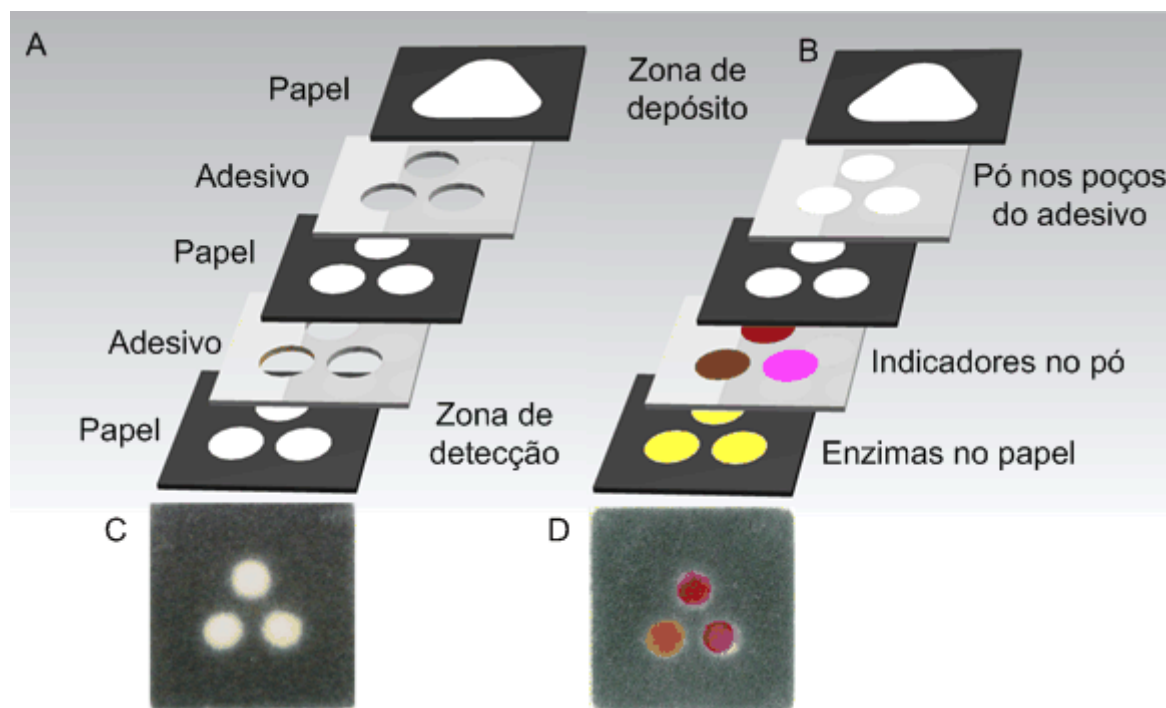


Figura 5.2: Ordem das camadas de papel e adesivo para a montagem do biossensor desenvolvido para a detecção de glucose: A) ordem das camadas alternadas de papel e adesivo de dupla face; B) Esquematização do biossensor 3D para detecção de glucose já com o pó de celulose nos poços do adesivo de dupla face e reagentes depositados. As soluções de enzimas e indicadores são incolores. As cores utilizadas no esquema têm o objetivo de facilitar a interpretação; C) Foto da zona de detecção de um biossensor 3D completo por usar; D) Foto da zona de detecção de um biossensor 3D após o teste a uma solução de glucose.

De forma a melhorar a montagem obtida anteriormente, acrescentou-se uma camada de papel e, consequentemente, uma camada de adesivo. Esta montagem está representada na Figura 5.2. Após vários testes concluiu-se que o volume mínimo de solução que garante o funcionamento do biossensor 3D é de 9 μL . A colocação das enzimas e indicadores foi testada em várias posições. Verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com o sistema representado na Figura 5.2B. O facto de o pó de celulose ter sido usado como libertador de indicador é produto dos resultados obtidos na secção 4.6.2, onde o pó foi comparado com o papel enquanto agente libertador de substâncias.

Foi depositado 1 μL de solução de enzimas nas três áreas que compõem a zona de detecção do biossensor. A solução de enzimas foi preparada com glucose oxidase (645 U ml^{-1} a partir de *Aspergillus niger*, 215 U mg^{-1}), *Horseradish* peroxidase (339 U ml^{-1} a partir de 52 U mg^{-1}) e 0,3 M de D-(+)-trehalose desidratada (de *Saccharomyces cerevisiae*, >99%), em solução tamponada de fosfato de sódio de concentração 10 mM e pH 8. De acordo com estudos anteriores, a trehalose é adicionada à solução de enzimas como estabilizador proteico, reduzindo a sua desnaturação durante o armazenamento [51]. Após a deposição o papel foi incubado à temperatura ambiente (cerca de 22°C) durante cerca de 15 minutos, permitindo a secagem da

zona de detecção. Colou-se uma camada de adesivo preenchida com pó de celulose. Colocou-se 2 µL de cada indicador no pó de celulose na ordem apresentada na Figura 5.3.

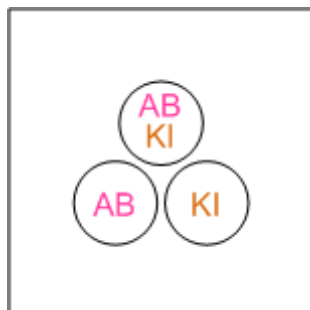


Figura 5.3: Ordem de colocação dos indicadores no pó de celulose contido nos poços criados nas camadas de adesivo.

O indicador denominado AB corresponde a uma mistura de rácio molar de 1:2 de 4-aminoantipirina (reagent grade) e 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato de sódio (ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico), com concentrações 4 mM e 8 mM, respetivamente. O indicador KI foi assim denominado por corresponder à fórmula química do reagente que o compõe, iodeto de potássio, e foi preparado com uma concentração de 0,5 M. O tempo de secagem para os indicadores foi cerca de 25 minutos. Concluiu-se a montagem dos biossensores de acordo com o esquema da Figura 5.2B.

Para calibrar a resposta dos biossensores foram preparadas 15 soluções com concentrações molares de D-(+)-glucose ($\geq 99,5\%$) em solução tamponada de fosfato de sódio com concentração 10 mM e pH 8. As concentrações utilizadas foram 0 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM e 100 mM de glucose. Foram depositados 9 µL de cada solução em cada biossensor.

Todos os reagentes acima referidos foram adquiridos na Sigma-Aldrich Co. (Spruce Street, St. Louis, MO, USA).

Os resultados foram digitalizados cerca de 10 a 15 minutos após a realização dos testes, através de um scanner Deskjet 4580 (HP, Palo Alto, CA, USA).

5.1.2. Análise e discussão de resultados

Na Figura 5.4 são mostrados exemplos de dispositivos utilizados no estudo da otimização do volume utilizado para os biossensores 3D. O volume mínimo que garante o percurso da solução na totalidade das zonas hidrófilas do dispositivo é 9 µL.

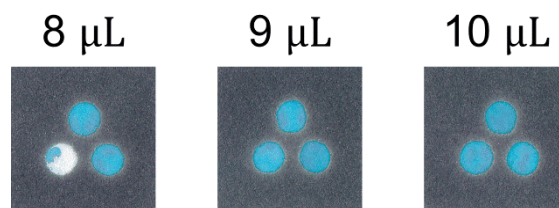


Figura 5.4: Zonas de detecção de dispositivos utilizados no estudo de otimização do volume para a execução dos ensaios com os biossensores.

A comparação entre a utilização de dispositivos com duas e três camadas de papel está ilustrada na Figura 5.5. É notório o refluxo de solução no caso dos dispositivos com apenas duas camadas. Este refluxo pode provocar contaminação de reagentes.

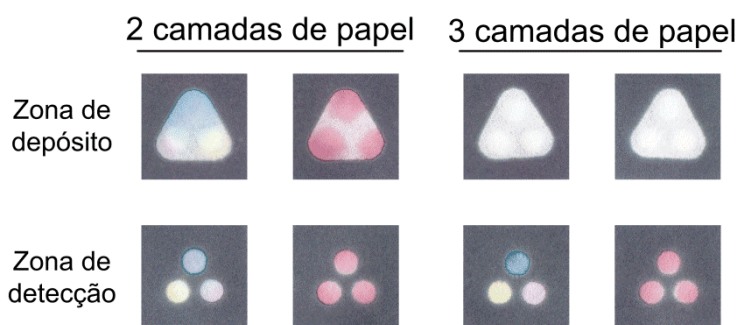


Figura 5.5: Comparação de zonas de depósito e detecção entre dispositivos com duas e três camadas de papel. Neste estudo o pó de celulose presente nos orifícios da camada de adesivo foi misturado com diferentes corantes alimentares.

Na Figura 5.6 são apresentadas zonas de detecção de biossensores cujo ensaio ocorreu com erro. O facto de algumas áreas na zona de detecção dos biossensores apresentarem anomalias é resultante da distribuição desequilibrada de pó de celulose pelos orifícios dos adesivos que unem as camadas de papel dos biossensores.

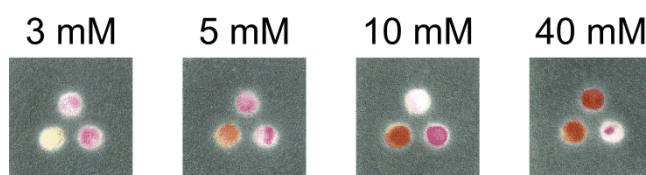


Figura 5.6: Erros nas zonas de detecção de biossensores 3D usados para a detecção e quantificação de glucose em soluções de diferentes concentrações.

Os resultados foram analisados visualmente e com recurso ao software ImageJ, no qual se mediu a intensidade dos canais RGB das digitalizações.

Na Figura 5.7 estão representados exemplos de resultados obtidos dos diferentes indicadores para cada concentração de glucose.

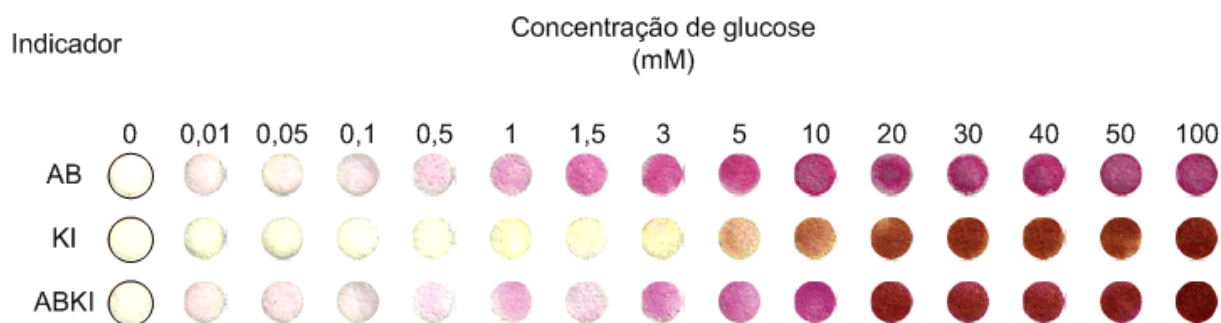


Figura 5.7: Ilustração dos resultados obtidos com os biossensores 3D de glucose. Para a concentração de 0 mM os resultados estão delimitados devido à dificuldade de identificação dos seus limites.

Ao observar a Figura 5.7 é notória a tendência para o aumento de intensidade das cores dos indicadores com o aumento da concentração da solução de glucose testada. Verifica-se também zonas de análise com coloração homogénea. O indicador AB permite a distinção visual entre 0,1 mM e 5 mM. Para valores abaixo dessa concentração não há atividade suficiente por parte do indicador para distinguir visualmente variações de concentração de glucose. Nos valores superiores a 5 mM verifica-se a saturação da intensidade colorimétrica. No caso do indicador KI é visível a alteração colorimétrica no intervalo de concentrações de 1 mM a 20 mM. O indicador ABKI apresenta um comportamento semelhante ao indicador AB para concentrações inferiores a 20 mM. A partir desse valor é o indicador KI que domina a influência na variação colorimétrica. A utilização de múltiplos indicadores com diferentes sensibilidades permite uma interpretação de resultados numa gama de concentrações alargada e com maior precisão, factor importante para o desempenho de um dispositivo POC.

Os gráficos obtidos pela análise dos canais RGB das digitalizações dos resultados dos biossensores estão representados na Figura 5.8. O sistema de cores RGB varia a intensidade dos seus canais entre 0 (o mais escuro possível) e 255 (o mais claro possível). Para uma análise intuitiva dos gráficos da Figura 5.8 optou-se por uma inversão de escala de maneira a que o aumento da concentração de glucose seja acompanhado pelo aumento de intensidade dos canais RGB. O comportamento dos canais RGB, em função da concentração de glucose, é semelhante para o indicador AB, como se pode verificar na Figura 5.8A. O canal com maior intensidade e melhor razão amplitude/erro é o verde. A saturação da intensidade do canal verde ocorre para concentrações superiores a 5 mM, o que já se tinha verificado com a análise visual dos resultados. Até essa concentração, o declive da curva que representa a variação da

intensidade do canal em função da concentração de glucose é acentuado, o que significa uma alta sensibilidade para baixas concentrações. Este comportamento também se verifica através da análise visual dos resultados para este indicador.

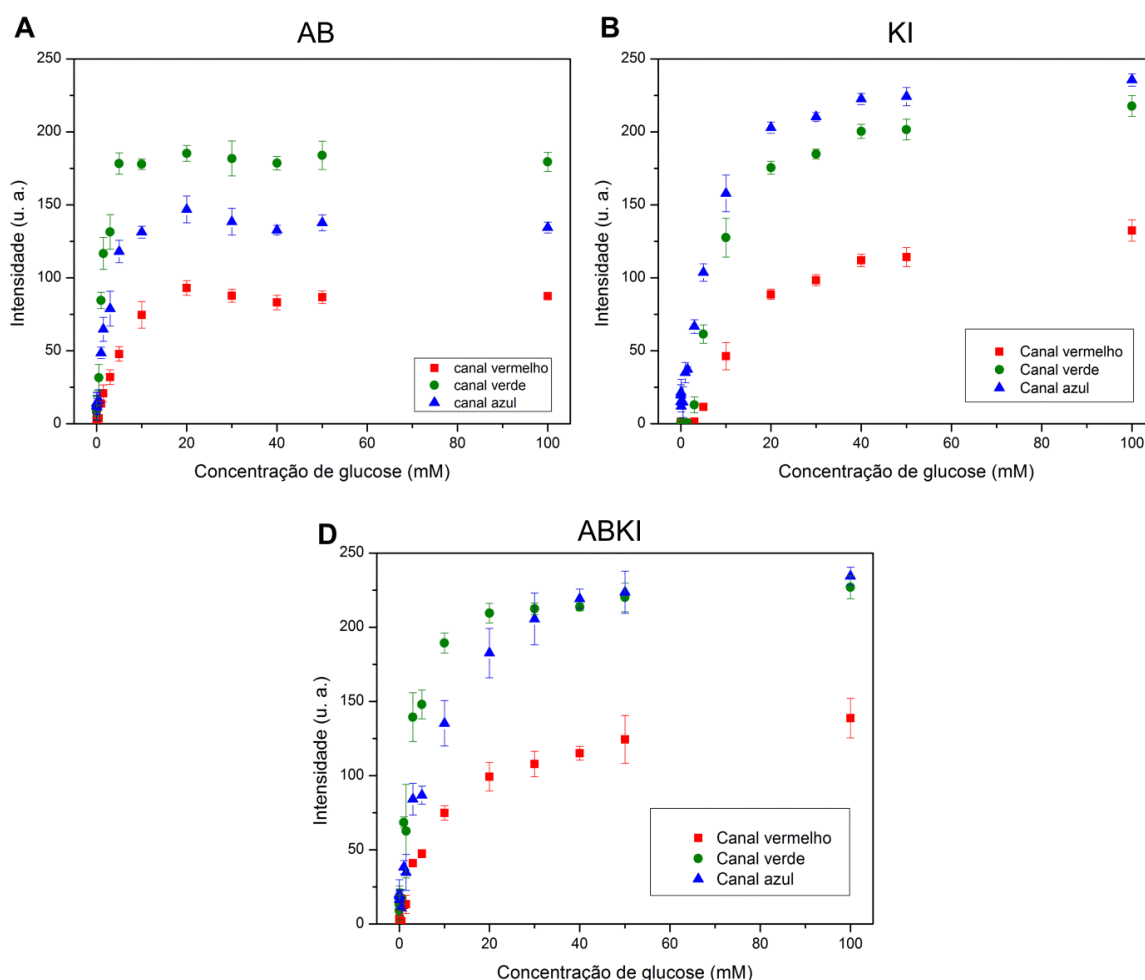


Figura 5.8: Gráficos da análise RGB para diferentes concentrações de glucose: A) indicador AB; B) indicador KI; C) indicador ABKI. Cada ponto representa a média de quatro valores obtidos nas mesmas condições. As barras de erro representam o desvio padrão dos valores, ou seja, a sua dispersão em relação à média.

No caso do indicador KI, Figura 5.8B, verifica-se novamente um comportamento semelhante entre os três canais. O canal azul apresenta a maior amplitude de intensidade, apesar de não ter a melhor razão amplitude/erro associado. Para concentrações menores que 5 mM este indicador demonstra uma sensibilidade menor que o indicador AB, tal como se verificou visualmente. A saturação da intensidade do canal azul para o indicador KI ocorre para concentrações superiores a 40 mM,

O comportamento dos canais RGB do indicador ABKI, que está representado na Figura 5.8C, também está de acordo com a análise visual. Para valores até 20 mM predomina o canal verde, que por sua vez é o dominante no que toca à intensidade dos canais para os resultados do indicador AB. A partir dessa concentração é o canal azul que se apresenta mais intenso. Na Figura 5.7 pode verificar-se que é exatamente a partir da concentração de 20 mM que a cor típica do indicador KI domina a zona de deteção. O indicador ABKI apresenta um limite de deteção inferior semelhante ao indicador AB e um limite de deteção superior semelhante ao indicador KI.

Apesar do indicador ABKI adotar o comportamento dos indicadores que o constituem, AB e KI dependendo do intervalo de concentrações, a sua presença no biossensor não deixa de ser importante para comparação de resultados já que o seu comportamento é semelhante ao do indicador AB para concentrações de glucose inferiores a 10 mM e ao do KI para concentrações maiores.

A Figura 5.9 destaca o desempenho dos indicadores na região das concentrações de glucose de interesse biológico [55].

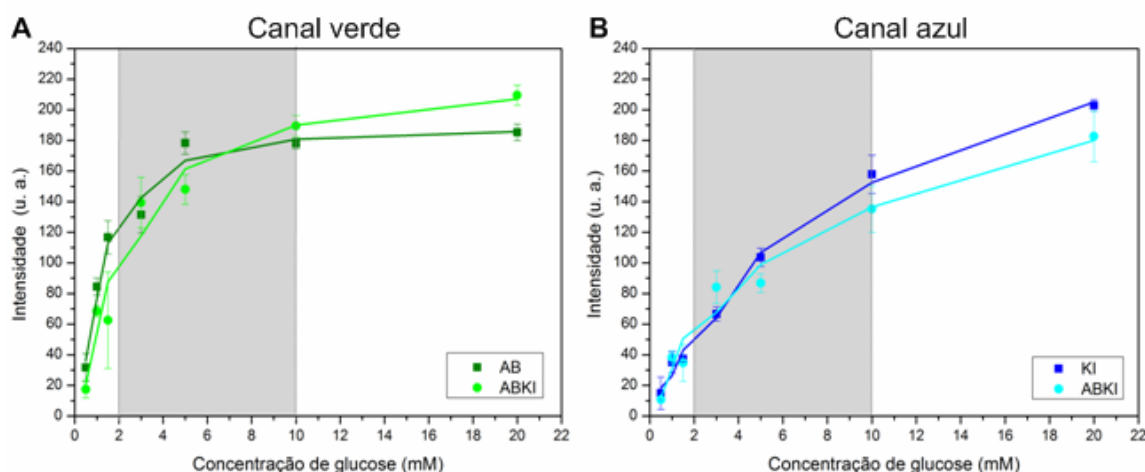


Figura 5.9: Comportamento dos indicadores na região de interesse biológico: A) Canal verde dos indicadores AB e ABKI; B) Canal azul dos indicadores KI e ABKI.

O canal verde do indicador AB, Figura 5.9A, permite uma distinção significativa do intervalo de 2 mM a 5 mM da região de interesse biológico. Na Figura 5.7 este intervalo é visível através da intensificação da cor rosa. A partir do valor 5 mM deixa de ser possível analisar os resultados colorimetricamente. O indicador ABKI tem um comportamento semelhante. Neste indicador houve problemas experimentais com os biossensores que testaram a concentração 1,5 mM. O erro associado é muito grande e o facto da intensidade do canal verde, para essa concentração, ser menor que o valor provocado por uma concentração de 1 mM, quebra todas as tendências

verificadas até aqui. O indicador ABKI apresenta maior declive entre 5 mM e 10 mM mostrando-se mais eficaz para a análise colorimétrica neste intervalo. Na Figura 5.7 é possível verificar este facto sob a forma de intensificação da cor rosa.

Na Figura 5.9B está representado o comportamento do canal azul na gama de concentrações de glucose com interesse biológico para os indicadores KI e ABKI. O indicador KI apresenta uma amplitude maior que o ABKI, sendo que dentro do intervalo assinalado a intensidade do canal azul varia de cerca de 100 unidades. Ao confrontar esta análise com a Figura 5.7 torna-se explícita a capacidade deste indicador para a distinção colorimétrica neste intervalo de concentrações.

De uma forma geral é o indicador KI que apresenta os melhores resultados para o intervalo com interesse biológico. Contudo, o comportamento dos restantes indicadores torna-se importante para a otimização de uma análise visual.

A Figura 5.10 mostra uma comparação entre resultados obtidos para biossensores 3D desenvolvidos neste estudo, com os obtidos por biossensores 2D desenvolvidos na tese de dissertação elaborada por Mafalda N. Costa [40].

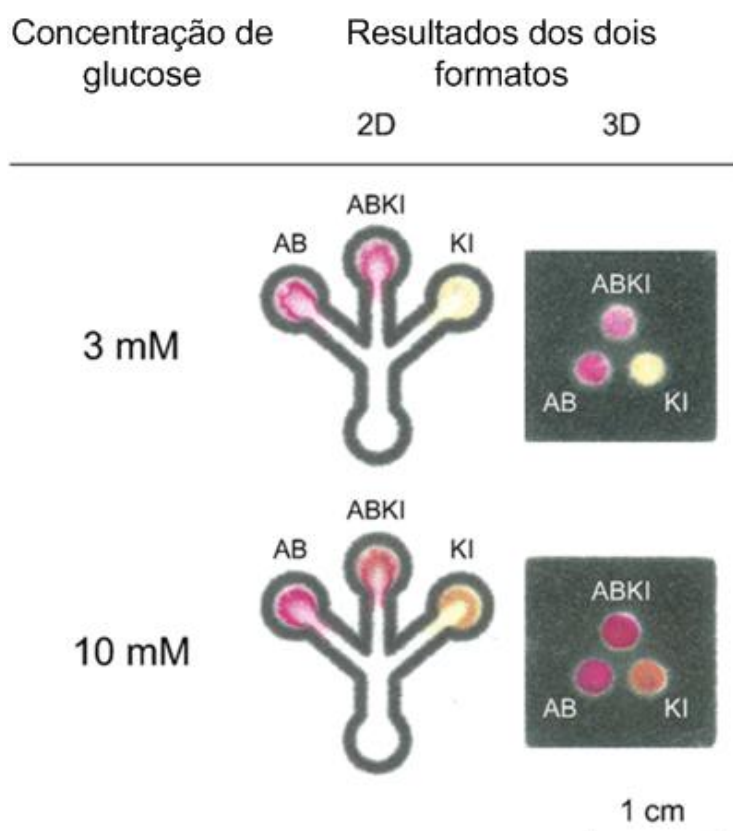


Figura 5.10: Comparação entre resultados obtidos e resultados prévios do grupo (adaptado de [40]).

Através da Figura 5.10, verifica-se a diferença de homogeneidade dos resultados colorimétricos obtidos com diferentes formatos. O acumular de indicadores em regiões específicas das zonas de detecção dos biossensores 2D deve-se à direção do fluxo da solução a analisar. Este arrastar de substâncias para zonas específicas não se verifica nas zonas de detecção dos biossensores 3D. Nestes, o fluxo da solução a analisar ocorre na direção do observador (direção vertical) o que diminui drasticamente o fenómeno de arrastamento dos indicadores, possibilitando uma análise visual mais fácil e precisa. A ordem de colocação de reagentes nos biossensores também mostrou afetar a homogeneidade das zonas de detecção.

6. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

Com o trabalho realizado foi possível concluir acerca da aptidão dos materiais e dos processos utilizados para a construção de biossensores 3D. O estudo desses materiais permitiu isolar as características que se devem ter em conta na procura de novos materiais para a construção de biossensores 3D em papel, enquanto que o estudo dos processos de fabrico possibilita a otimização dos biossensores para atingir os seus objetivos.

O papel de cromatografia Whatman nº1 apresenta-se como um substrato constituído essencialmente por celulose não modificada, polímero hidrófilo que assegura o transporte de soluções aquosas por capilaridade. A análise por EDS indicou a presença de carbono e oxigénio no papel que, em conjunto com o hidrogénio, não detetável por esta técnica, formam o monómero da celulose, a glucose. As técnicas de análise estrutural confirmam a presença de celulose no papel através da comparação de bandas no espectro de FTIR e dos planos cristalográficos no difratograma obtido por DRX, próprios do polímero. O facto de a celulose ser biocompatível e pouco reativa quimicamente é importante para a preservação das propriedades dos fluidos a analisar. Por outro lado torna-se mais difícil ativar quimicamente (imobilização de substâncias) o papel, algo que poderá ser útil para fins como bioreconhecimento de um par antígeno-anticorpo. Como solução para este problema, um biossensor 3D oferece a possibilidade de utilização de diferentes materiais em camadas distintas para funções específicas.

As imagens do papel obtidas por SEM mostram uma estrutura porosa constituída por uma rede de fibras longas. Essa estrutura, aliada à hidrofília assegurada pela determinação de um ângulo de contacto com água inferior a 15°, garantem as condições necessárias para o fluxo de soluções por capilaridade. Do trabalho efetuado conclui-se que papéis, cuja composição seja celulose não modificada, serão quimicamente aptos para a constituição de um biossensor. Verificou-se a importância dos métodos de fabrico do papel, na aplicação deste, para fins de microfluídica. O processo de refinação influencia a orientação das fibras do papel o que provoca alterações na velocidade do fluxo de uma solução aquosa, dependentes da direção dos canais (e consequentemente do fluxo da solução) na folha de papel. Contudo, esta característica estrutural só influencia o percurso de uma solução para canais com distâncias superiores a 15 mm, a partir de onde os canais orientados na direção vertical da folha de papel apresentam fluxos mais rápidos, como se ilustra na Figura 5.3. Os resultados obtidos para as velocidades do fluxo de uma solução aquosa no papel, em função da distância percorrida pela solução, podem ser utilizados no desenho de um biossensor de maneira a promover contactos, mais ou menos morosos, entre substâncias. Também ficou clara a influência da humidade relativa durante a execução de um ensaio de microfluídica em papel. Para canais com 1 cm de comprimento, um acréscimo de 1% de humidade relativa, no intervalo de 28 % a 44 %, diminui o tempo de

percurso em 0,51 segundos, enquanto que no caso dos canais com 1,8 cm esse acréscimo de humidade relativa diminui o tempo de percurso da solução em 2,85 segundos.

O resultado da caracterização do pó de celulose utilizado indica-o muito semelhante, quimicamente, ao papel Whatman. As maiores diferenças entre os dois materiais são a sua cristalinidade (o papel apresentou um índice de cristalinidade de 87,13 % e o pó de 59,74 %) e a forma como as suas fibras estão dispostas (no papel forma uma rede e no pó encontram-se soltas). Sendo composto essencialmente por celulose, o pó de celulose possui propriedades hidrófilas que garantem a sua adequabilidade enquanto constituinte de canais (verticais) em dispositivos de microfluídica em papel com formato 3D. Verificou-se que a quantidade de pó de celulose colocada num orifício do adesivo, que une camadas de papel, influencia o desempenho do dispositivo. Conclui-se que a formação de um canal com um volume de 1 mm^3 necessita de uma massa de aproximadamente 1 mg de pó de celulose, apesar de para volumes bastante inferiores este factor se reduzir. Para além de servir como um elemento passivo no dispositivo de microfluídica ficou claro que, o pó de celulose pode também assumir um papel ativo no que toca ao armazenamento e libertação de proteínas. Mais de 77 % da proteína BSA libertada por pó de celulose foi arrastada em mais de um centímetro enquanto que no caso do papel como fonte libertadora de proteína só 53% da proteína foi deslocada para além do primeiro centímetro. Este resultado é importante para biossensores que necessitem de uma zona de conjugação, por exemplo, mas também deixa em aberto a possibilidade de utilização para a libertação de outras substâncias para além de proteínas. No estudo da aplicação de biossensores 3D ao teste de glucose concluiu-se que quantidades não homogéneas de pó em orifícios paralelos conduzem a uma distribuição irregular de solução pelo dispositivo, o que pode provocar reações colorimétricas não homogéneas nas zonas de teste e, como consequência, leituras irregulares de resultados.

O método de padronização de canais de microfluídica por impressão de cera em papel mostrou-se rápido, simples e eficaz. Com o desenho dos canais efetuado, o processo de criação de barreiras no papel demora cerca de dois minutos. Verificou-se a hidrofobia da cera utilizada (tinta sólida da marca Xerox) através da obtenção de ângulos de contacto com água superiores a 110° . As barreiras construídas no papel com a quantidade de cera, temperatura e tempo de difusão indicados confinaram eficazmente as soluções aquosas nos canais desenvolvidos. O encapsulamento de canais por cera não os isola completamente do ambiente, e provoca acréscimos nos tempos de percurso de fluidos. Para canais com 1 cm de comprimento o encapsulamento aumenta o tempo de percurso por parte do fluxo em 18% em relação ao tempo do fluxo num canal livre. No caso dos canais com 1,8 cm de comprimento o aumento do intervalo de tempo é de 55%.

O adesivo de dupla face é um constituinte necessário na construção dos dispositivos de microfluídica em papel com formato 3D estudados neste trabalho. Tem de ser um material hidrófobo capaz de unir camadas de papel e de possível padronização. O método de padronização de adesivo que apresenta melhor resultado é o corte a laser. O desempenho do

dispositivo de microfluídica em papel depende do tipo de adesivo utilizado, pois a sua elasticidade e a taxa com que liberta resinas ao longo do tempo nos poros do papel influenciam o percurso de fluidos nos canais de papel do dispositivo. Dos adesivos estudados aquele que influencia menos o fluxo da solução é o adesivo “G”. Este adesivo provoca um acréscimo no percurso de canais com 1,8 cm de cerca de 50 segundos após o contacto com o canal e cerca de 90 segundos após uma semana de contacto com o canal, em relação ao percurso num canal sem adesivo.

Foi estudada a aplicação de dispositivos de microfluídica em papel com formato 3D como biossensores para a deteção e quantificação de glucose em soluções aquosas. Verificou-se o funcionamento dos canais criados por barreiras de cera no papel bem como o isolamento criado pelo adesivo entre camadas de papel. Após vários testes concluiu-se que a melhor estrutura de biossensor e disposição de reagentes para uma homogeneidade dos resultados nas zonas de deteção é a apresentada na Figura 5.2. O volume de solução determinado como ótimo para a realização dos testes é de 9 μ L. Através da aplicação do formato 3D para dispositivos de microfluídica em papel para a deteção e quantificação de glucose em soluções aquosas obteve-se uma relação entre a concentração de glucose e a intensidade da cor obtida por reações colorimétricas. Esta relação foi conseguida para os dois indicadores testados individualmente (AB e KI) bem como para a sua mistura (ABKI). O diferente comportamento de cada indicador permite uma leitura de resultados e consequente aferição da concentração de glucose presente na solução a analisar mais precisa. Os biossensores 3D criados conseguem quantificar a concentração de glucose no intervalo de 0,1 mM a 20mM o que engloba os valores de interesse biológico para o nível de glucose no sangue. A utilização do formato 3D para biossensores em papel para a deteção de glucose apresentou vantagens em relação ao formato 2D, já que possibilita zonas de teste com coloração mais homogénea.

No sentido de se continuar a otimizar o desenvolvimento de biossensores em papel com formato 3D devem ser efetuados estudos para a simplificação da sua montagem, para o aumento de controlo da colocação de pó de celulose nos orifícios do adesivo, para encontrar soluções capazes de filtrar células sanguíneas e para a verificação da estabilidade dos reagentes envolvidos a médio/longo prazo. O design do biossensor 3D desenvolvido pode ser aplicado para a deteção de outros marcadores.

A tecnologia desenvolvida neste trabalho é bastante promissora e pode ter um impacto social elevado pois está provado que são conseguidos resultados com biossensores de fabricação simples, baratos e não poluentes, o que facilita o seu acesso a países com poucos recursos, onde métodos de diagnóstico complexos e dispendiosos se tornam inacessíveis.

Bibliografia

- [1] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics.," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–73, Jul. 2006.
- [2] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*. 2007.
- [3] T. Squires and S. Quake, "Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale," *Reviews of modern physics*, vol. 77, no. July, 2005.
- [4] A. Radenovic, "MICROFLUIDICS LAB ON CHIP," *ssv.epfl.ch*. pp. 1–27.
- [5] L. Y. Yeo, H.-C. Chang, P. P. Y. Chan, and J. R. Friend, "Microfluidic devices for bioapplications.," *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 7, no. 1, pp. 12–48, Jan. 2011.
- [6] C.-Y. Lee, C.-L. Chang, Y.-N. Wang, and L.-M. Fu, "Microfluidic mixing: a review.," *International journal of molecular sciences*, vol. 12, no. 5, pp. 3263–87, Jan. 2011.
- [7] J. L. Osborn, B. Lutz, E. Fu, P. Kauffman, D. Y. Stevens, and P. Yager, "Microfluidics without pumps: reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks.," *Lab on a chip*, vol. 10, no. 20, pp. 2659–65, Oct. 2010.
- [8] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, and B. H. Weigl, "Microfluidic diagnostic technologies for global public health.," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 412–8, Jul. 2006.
- [9] X. Li, D. R. Ballerini, and W. Shen, "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends.," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, pp. 11301–1130113, Mar. 2012.
- [10] C. Rivet, H. Lee, A. Hirsch, S. Hamilton, and H. Lu, "Microfluidics for medical diagnostics and biosensors," *Chemical Engineering Science*, vol. 66, no. 7, pp. 1490–1507, Apr. 2011.
- [11] A. Martinez and S. Phillips, "Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices," *Analytical ...*, 2009.
- [12] T. L. Staples and D. G. Shaffer, "Wicking flow in irregular capillaries," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 204, no. 1–3, pp. 239–250, May 2002.
- [13] E. Washburn, "The dynamics of capillary flow," *Physical review*, 1921.
- [14] J. C. Roberts, *The Chemistry of Paper*. The Royal Society of Chemistry, 1996.
- [15] "Confederation of Paper Industries." [Online]. Available: http://www.paper.org.uk/information/factsheets/paper_and_its_uses.pdf.
- [16] P. D. Klemm, P. H. Schmauder, and Thomas Heinze, "Cellulose," in *Biopolymers Online*, WILEY, 2005, pp. 275–287.
- [17] "The Structure of Wood." [Online]. Available: http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/wood/structure_wood_pt1.php.

- [18] "Hemicellulose." [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hemicellulose.png>.
- [19] "Lignin Structure." [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lignin_structure.svg.
- [20] R. Pelton, "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009.
- [21] R. Müller and D. Clegg, "Automatic paper chromatography," *Analytical Chemistry*, pp. 1123–1125, 1949.
- [22] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, and B. Lin, "Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay," *Electrophoresis*, 2009.
- [23] E. Carrilho, S. T. Phillips, S. J. Vella, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Paper microzone plates.," *Analytical chemistry*, vol. 81, no. 15, pp. 5990–8, Aug. 2009.
- [24] V. Leung, A.-A. M. Shehata, C. D. M. Filipe, and R. Pelton, "Streaming potential sensing in paper-based microfluidic channels," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 364, no. 1–3, pp. 16–18, Jul. 2010.
- [25] B. Veigas, J. M. Jacob, M. N. Costa, D. S. Santos, M. Viveiros, J. Inácio, R. Martins, P. Barquinha, E. Fortunato, and P. V. Baptista, "Gold on paper-paper platform for Au-nanoprobe TB detection.," *Lab on a chip*, vol. 12, no. 22, pp. 4802–8, Nov. 2012.
- [26] H. Noh and S. T. Phillips, "Fluidic timers for time-dependent, point-of-care assays on paper.," *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 19, pp. 8071–8, Oct. 2010.
- [27] J. Olkkonen, K. Lehtinen, and T. Erho, "Flexographically printed fluidic structures in paper.," *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 24, pp. 10246–50, Dec. 2010.
- [28] K. Abe, K. Kotera, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet-printed paperfluidic immuno-chemical sensing device," *Analytical and bioanalytical ...*, 2010.
- [29] K. Abe, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper.," *Analytical chemistry*, vol. 80, no. 18, pp. 6928–34, Sep. 2008.
- [30] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, and W. Shen, "Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma," vol. 80, no. 2008903553, pp. 9131–9134, 2008.
- [31] X. Li, J. Tian, G. Garnier, and W. Shen, "Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing.," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 76, no. 2, pp. 564–70, Apr. 2010.
- [32] J. L. Delaney, C. F. Hogan, J. Tian, and W. Shen, "Electrogenerated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors.," *Analytical chemistry*, vol. 83, no. 4, pp. 1300–6, Feb. 2011.
- [33] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, "Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays.," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 46, no. 8, pp. 1318–20, Jan. 2007.
- [34] A. Martinez, "Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape," *PNAS*, 2008.

- [35] E. M. Fenton, M. R. Mascarenas, G. P. Lopez, and S. S. Sibbett, "Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping," *ACS Appl Mater. Interfaces*, pp. 124–129, 2009.
- [36] W. Wang, W.-Y. Wu, and J.-J. Zhu, "Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration.," *Journal of chromatography. A*, vol. 1217, no. 24, pp. 3896–9, Jun. 2010.
- [37] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing.," *The Analyst*, vol. 136, no. 1, pp. 77–82, Jan. 2011.
- [38] G. Chitnis, Z. Ding, C.-L. Chang, C. a Savran, and B. Ziaie, "Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform.," *Lab on a chip*, vol. 11, no. 6, pp. 1161–5, Mar. 2011.
- [39] D. a Bruzewicz, M. Reches, and G. M. Whitesides, "Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper.," *Analytical chemistry*, vol. 80, no. 9, pp. 3387–92, May 2008.
- [40] M. N. Costa, "Desenvolvimento de Microfluídica em Papel para Utilização em Biossensores." 2012.
- [41] M. Nishizaki and N. Kobayashi, "Hot-melt solid ink composition," *EP Patent 0,844,287*, 2000.
- [42] G. G. Lewis, M. J. DiTucci, M. S. Baker, and S. T. Phillips, "High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices.," *Lab on a chip*, vol. 12, no. 15, pp. 2630–3, Aug. 2012.
- [43] H. Liu and R. M. Crooks, "Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 44, pp. 17564–6, Nov. 2011.
- [44] S. J. Vella, P. Beattie, R. Cademartiri, A. Laromaine, A. W. Martinez, S. T. Phillips, K. A. Mirica, and G. M. Whitesides, "Measuring Markers of Liver Function Using a Micropatterned Paper Device Designed for Blood from a Fingertick," 2012.
- [45] L. Ge, J. Yan, X. Song, M. Yan, S. Ge, and J. Yu, "Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence immunodevice for multiplexed measurement of biomarkers and point-of-care testing.," *Biomaterials*, vol. 33, no. 4, pp. 1024–31, Feb. 2012.
- [46] D. W. G. Morrison, M. R. Dokmeci, and U. Demirci, "Clinical Applications of Micro- and Nanoscale Biosensors," in *Biomedical Nanostructures*, no. 1, WILEY, 2008, pp. 433–458.
- [47] K. Kiilerich-Pedersen, C. Poulsen, J. Daprà, N. O. Christiansen, and N. Rozlosnik, "Polymer Based Biosensors for Pathogen Diagnostics," in *Environmental Biosensors*, V. Somerset, Ed. InTech, 2011, pp. 193–212.
- [48] T. Vo-Dinh and B. Cullum, "Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics.," *Fresenius' journal of analytical chemistry*, vol. 366, no. 6–7, pp. 540–51, 2008.
- [49] C. Parolo and A. Merkoçi, "Paper-based nanobiosensors for diagnostics.," *Chemical Society reviews*, vol. 42, no. 2, pp. 450–7, Jan. 2013.
- [50] A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, and G. M. Whitesides, "Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic

- devices for real-time, off-site diagnosis.," *Analytical chemistry*, vol. 80, no. 10, pp. 3699–707, May 2008.
- [51] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices.," *Analytica chimica acta*, vol. 674, no. 2, pp. 227–33, Aug. 2010.
- [52] S. a Klasner, A. K. Price, K. W. Hoeman, R. S. Wilson, K. J. Bell, and C. T. Culbertson, "Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva.," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 397, no. 5, pp. 1821–9, Jul. 2010.
- [53] Z. Nie, F. Deiss, X. Liu, O. Akbulut, and G. M. Whitesides, "Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers.," *Lab on a chip*, vol. 10, no. 22, pp. 3163–9, Nov. 2010.
- [54] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry*, Fourth. 2013.
- [55] "Who-Diabetes," 2013. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
- [56] D. Schroder, *Semiconductor Material and Device Characterization*, Third Edit. WILEY, 2006.
- [57] M. C. Miller, "X-Ray Fluorescence," in *Passive Nondestructive Assay Manual*, US Nuclear Regulatory Commission, 1991, pp. 313–336.
- [58] C. R. Brundle, J. Charles A. Evans, and S. Wilson, *Encyclopedia of Materials Characterization*. Manning Publications Co., 1992.
- [59] B. Stuart, *INFRARED SPECTROSCOPY: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS*. WILEY, 2004, p. 224.
- [60] "Bragg's Law." [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:BraggPlaneDiffraction.svg>.
- [61] C. Hammond, *The Basics of Crystallography and Diffraction*, Third Edit. Oxford Science Publications, 2009.
- [62] E. L. Decker, B. Frank, Y. Suo, and S. Garoff, "Physics of contact angle measurement," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 156, no. 1–3, pp. 177–189, Oct. 1999.
- [63] J. L. IHRIG and D. Y.F.LAI, "CONTACT ANGLE MEASUREMENT," *JOURNAL OF CHEMICAL EDUCATION*, 1957.
- [64] P. Echlin, *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. Springer, 2009.
- [65] J. Goldstein, D. Newbury, D. Joy, and C. Lyman, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. 2003.
- [66] K. M. Schilling, A. L. Lepore, J. a Kurian, and A. W. Martinez, "Fully enclosed microfluidic paper-based analytical devices.," *Analytical chemistry*, vol. 84, no. 3, pp. 1579–85, Feb. 2012.
- [67] "Refractive Index." [Online]. Available: <http://refractiveindex.info/?group=PLASTICS&material=Cellulose>.

- [68] S. N. Kasarova, N. G. Sultanova, C. D. Ivanov, and I. D. Nikolov, "Analysis of the dispersion of optical plastic materials," *Optical Materials*, vol. 29, no. 11, pp. 1481–1490, Jul. 2007.
- [69] H. S. Ibrahim, N. S. Ammar, M. Soylak, and M. Ibrahim, "Removal of Cd(II) and Pb(II) from aqueous solution using dried water hyacinth as a biosorbent.," *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, vol. 96, pp. 413–20, Oct-2012.
- [70] V. Tserki, N. E. Zafeiropoulos, F. Simon, and C. Panayiotou, "A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres," *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, vol. 36, no. 8, pp. 1110–1118, Aug. 2005.
- [71] L. M. Proniewicz, C. Paluszkiwicz, A. Weselucha-Birczyńska, H. Majcherczyk, A. Barański, and A. Konieczna, "FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose," *Journal of Molecular Structure*, vol. 596, no. 1–3, pp. 163–169, Sep-2001.
- [72] R. Chen, K. a. Jakes, and D. W. Foreman, "Peak-fitting analysis of cotton fiber powder X-ray diffraction spectra," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 93, no. 5, pp. 2019–2024, Sep. 2004.
- [73] E. Hult, T. Iversen, and J. Sugiyama, "Characterization of the supermolecular structure of cellulose in wood pulp fibres," pp. 103–110, 2003.
- [74] T. Lappalainen, T. Teerinen, P. Vento, L. Hakalahti, and T. Erho, "Cellulose as a novel substrate for lateral flow assay," vol. 25, no. 4, pp. 536–550, 2010.
- [75] R. Förch, H. Schönherr, and A. T. A. Jenkins, Eds., *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology*. Wiley, 2009.
- [76] J. A. M. Jacob, "DESENVOLVIMENTO DE PLACAS DE MICRO TITULAÇÃO EM PAPEL." 2013.
- [77] A.-M. Olsson and L. Salmén, "The association of water to cellulose and hemicellulose in paper examined by FTIR spectroscopy.," *Carbohydrate research*, vol. 339, no. 4, pp. 813–8, Mar. 2004.
- [78] A. Hamraoui and T. Nylander, "Analytical approach for the Lucas-Washburn equation.," *Journal of colloid and interface science*, vol. 250, no. 2, pp. 415–21, Jun. 2002.
- [79] G. V. Malysheva and N. V. Bodrykh, "Hot-melt adhesives," *Polymer Science Series D*, vol. 4, no. 4, pp. 301–303, Nov. 2011.
- [80] C. Derail, M. N. Cazenave, F. X. Gibert, G. Marin, N. Kappes, and J. Lechat, "RHEOLOGICAL PROPERTIES OF HOT-MELT PRESSURE- SENSITIVE ADHESIVE (HMPSAs) BASED ON STYRENE – ISOPRENE COPOLYMERS . PART 2 : INNOVATIVE MOLECULAR FORMUIATION," *The Journal of Adhesion*, vol. 80, no. April, pp. 1131–1151, 2004.
- [81] P. Maynard, K. Gates, C. Roux, and C. Lennard, "Adhesive tape analysis: establishing the evidential value of specific techniques.," *Journal of forensic sciences*, vol. 46, no. 2, pp. 280–7, Mar. 2001.
- [82] W.-H. Dong, T.-Y. Wang, F. Wang, and J.-H. Zhang, "Simple, time-saving dye staining of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using Coomassie blue.," *PloS one*, vol. 6, no. 8, p. e22394, Jan. 2011.

- [83] R. Westermeier and R. Marouga, "Protein detection methods in proteomics research.," *Bioscience reports*, vol. 25, no. 1–2, pp. 19–32, 2005.
- [84] "Academia Sinica." [Online]. Available: [http://ipmb.sinica.edu.tw/proteomics/Documents/Coomassie Staining.pdf](http://ipmb.sinica.edu.tw/proteomics/Documents/Coomassie%20Staining.pdf).
- [85] "Reynolds number." [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Reynolds_number#Flow_in_pipe.

Anexos

Anexo A: Impressões a cera em papel Whatman^o1.

Esta folha é de papel de cromatografia Whatman nº1, utilizado na construção dos canais e dispositivos de microfluídica apresentados neste trabalho.

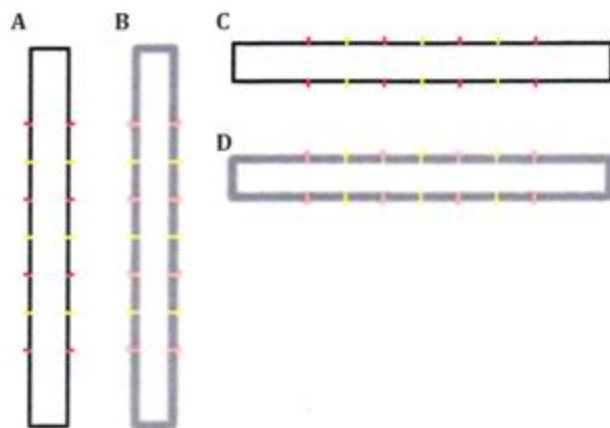


Figura A1: Os canais A e B estão na direcção vertical da folha de papel Whatman e os canais C e D estão na direcção horizontal. Os canais A e C estão apenas impressos não sendo funcionais. Os canais B e D passaram pelo processo de difusão encontrando-se nas mesmas condições dos utilizados no estudo da secção 4.3.



Figura A2: O canal A está apenas impresso no papel não sendo funcional. O canal B passou pelo processo de difusão encontrando-se nas mesmas condições dos utilizados no estudo da secção 4.2.2.

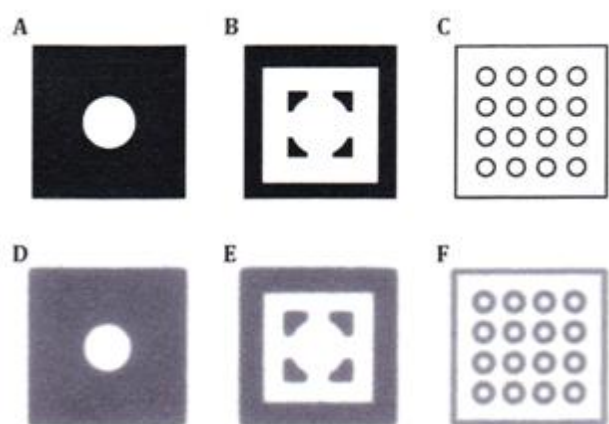


Figura A3: As camadas A, B e C foram apenas impressas não estando funcionais para a montagem de um dispositivo de microfluídica em papel com formato 3D. As camadas D, E e F passaram pelo processo de difusão encontrando-se nas mesmas condições das utilizadas na montagem do dispositivo no estudo da secção 4.1.

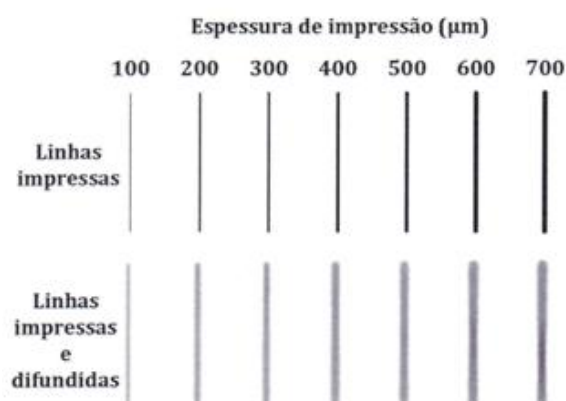


Figura A4: Exemplos de linhas envolvidas no estudo apresentado na Figura 4.4.



Esta folha é de papel de cromatografia Whatman nº1, utilizado na construção dos canais e dispositivos de microfluídica apresentados neste trabalho.

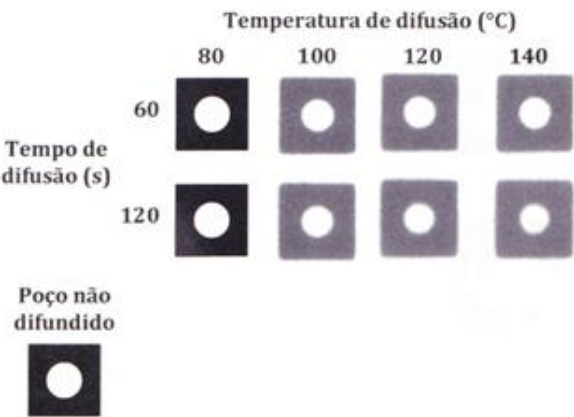


Figura A5: Exemplos de poços envolvidos no estudo apresentado na Tabela 4.1.



Figura A6: Encapsulamento a cera de uma superfície do tipo de canal utilizado para o estudo apresentado na secção 4.2.

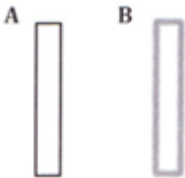


Figura A7: O canal A foi apenas impresso não sendo funcional. O canal B passou pelo processo de difusão encontrando-se nas mesmas condições dos canais utilizados no estudo da secção 4.6.

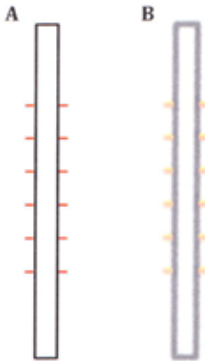


Figura A8: O canal A foi apenas impresso não sendo funcional. O canal B passou pelo processo de difusão encontrando-se nas mesmas condições dos canais utilizados no estudo da secção 4.6.

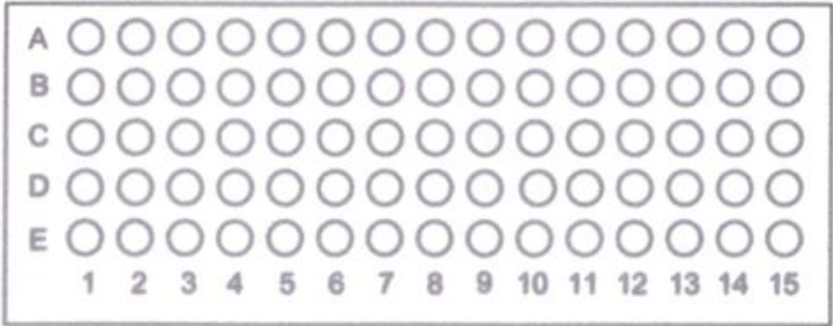
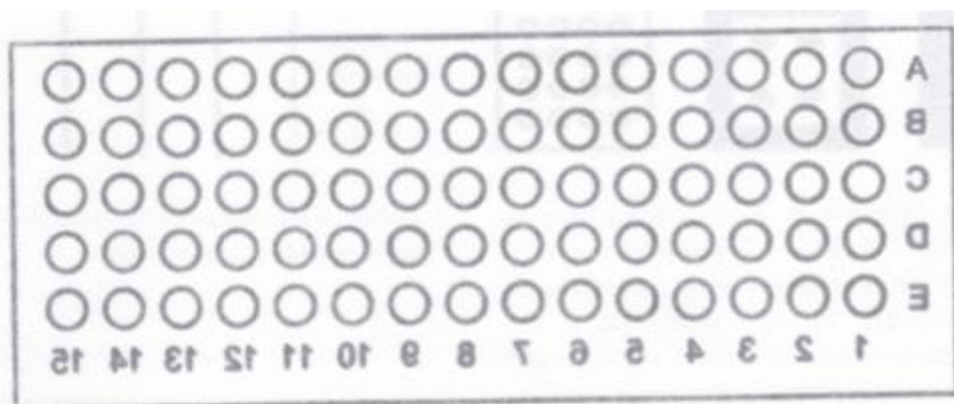
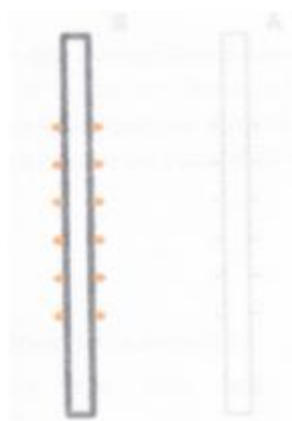
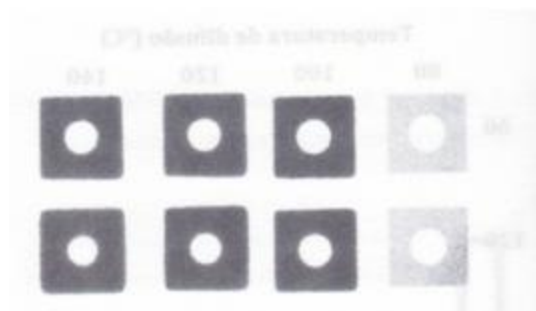


Figura A9: Matriz de poços nas mesmas condições da utilizada no estudo da secção 4.6.



Esta folha é de papel de cromatografia Whatman nº1, utilizado na construção dos canais e dispositivos de microfluídica apresentados neste trabalho.

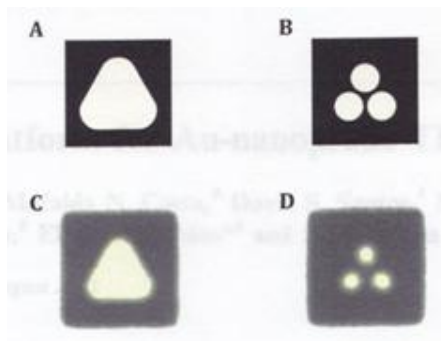
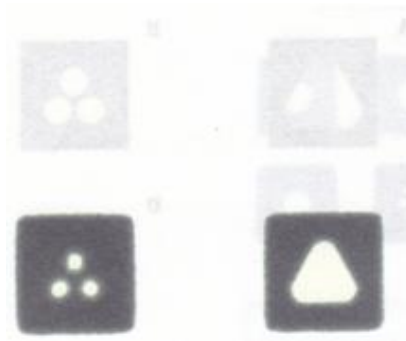


Figura A10: As camadas A e B foram apenas impressas não sendo funcionais para a montagem de um dispositivo de microfluídica em papel com formato 3D. As camadas C e D passaram pelo processo de difusão e encontram-se nas mesmas condições das utilizadas na montagem do dispositivo no estudo da secção 6.1.



Anexo B: Artigo publicado no decorrer deste trabalho.

Cite this: *Lab Chip*, 2012, 12, 4802–4808

www.rsc.org/loc

PAPER

Gold on paper—paper platform for Au-nanoprobe TB detection†

Bruno Veigas,^{ab} Jorge M. Jacob,^b Mafalda N. Costa,^b David S. Santos,^b Miguel Viveiros,^c João Inácio,^d Rodrigo Martins,^b Pedro Barquinha,^b Elvira Fortunato^{*b} and Pedro Viana Baptista^{*a}

Received 29th June 2012, Accepted 29th August 2012

DOI: 10.1039/c2lc40739f

Tuberculosis (TB) remains one of the most serious infectious diseases in the world and the rate of new cases continues to increase. The development of cheap and simple methodologies capable of identifying TB causing agents belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC), at point-of-need, in particular in resource-poor countries where the main TB epidemics are observed, is of paramount relevance for the timely and effective diagnosis and management of patients. TB molecular diagnostics, aimed at reducing the time of laboratory diagnostics from weeks to days, still require specialised technical personnel and labour intensive methods. Recent nanotechnology-based systems have been proposed to circumvent these limitations. Here, we report on a paper-based platform capable of integrating a previously developed Au-nanoprobe based MTBC detection assay—we call it “Gold on Paper”. The Au-nanoprobe assay is processed and developed on a wax-printed microplate paper platform, allowing unequivocal identification of MTBC members and can be performed without specialised laboratory equipment. Upon integration of this Au-nanoprobe colorimetric assay onto the 384-microplate, differential colour scrutiny may be captured and analysed with a generic “smartphone” device. This strategy uses the mobile device to digitalise the intensity of the colour associated with each colorimetric assay, perform a Red Green Blue (RGB) analysis and transfer relevant information to an off-site lab, thus allowing for efficient diagnostics. Integration of the GPS location metadata of every test image may add a new dimension of information, allowing for real-time epidemiologic data on MTBC identification.

1 Introduction

Tuberculosis (TB) is mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, Mtb), a member of the *M. tuberculosis* Complex (MTBC) and, according to the World Health Organisation, it remains one of the most serious infectious diseases in the world, responsible for 1.1 million deaths and 8.8 million new cases in 2010 alone.¹ Recent advances in molecular diagnostics of TB have improved the detection capability of the pathogen but many of these methods require specialised technical personnel and expensive laboratory equipment.^{2–6} Several new technologies are under development, which will enable the presumptive detection of MTBC in just one to two days. Diagnostics at point-of-need is crucial to TB control as rapid identification and pathogen

characterisation may allow patients to get immediate treatment that is vital in addressing this pandemic.

Recently, there have been reports on paper-based analytical systems suitable for application in diagnostics at point-of-need.^{7–10} An interesting approach combines the use of inexpensive paper-based platforms and digital image analysis to screen for relevant analytes.¹¹ This concept makes use of quantitative colorimetric correlations using mobile cameras to digitalise results allowing the measurement of colour intensity, *i.e.* to conduct quantitative microscale bioanalysis assays without expensive laboratory equipment. Recently, Carrilho and colleagues extended this concept *via* multizone standard 384-well paper microplates to be used as an alternative to conventional multiwell plates fabricated in moulded polymers.^{12,13} Paper-based plates are functionally related to plastic well plates, and offer interesting capabilities, such as (i) multiplex assays; (ii) the ability to store, mix, and combine reagents; (iii) multiple sample assaying with a single device; and (iv) the ability to capture the result in a digital image format with a generic mobile device. The fabrication process involves two core operations: printing patterns of wax on the surface of the paper and melting the wax into the paper to form complete hydrophobic barriers. Only just have paper platforms been used for gold nanoparticle based surface enhanced Raman scattering (SERS) bio-detection assays.^{14,15}

^aCIGMH, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal. E-mail: pmvb@fct.unl.pt; Fax: + 351 21 294 8530

^bCENIMAT/IBN, Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal. E-mail: emf@fct.unl.pt

^cGrupo de Micobactérias, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

^dInstituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP, Lisboa, Portugal

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: See DOI: 10.1039/c2lc40739f

Despite the wide range of nanoscale systems for biomolecular assays,^{16–18} those based on nanoparticles, and gold nanoparticles (AuNPs) in particular, have been the most widely used for TB diagnostics.^{19–22} These AuNPs exhibit amazing properties, such as intense colours and ease of functionalisation with relevant biomolecular moieties for bio-recognition, *e.g.* antibodies and ssDNA oligonucleotides. Solutions containing AuNPs usually exhibit an intense red colour derived from the surface plasmon resonance (SPR) band centred around 520 nm; AuNP aggregation results in a red-shift of the SPR and the solution changes colour to blue.²³ The first use of such properties for the detection of *M. tuberculosis* was introduced by our group in 2006 in an assay that relied on the colorimetric changes of a solution containing AuNPs functionalised with thiol-modified ssDNA oligonucleotides (Au-nanoprobe) complementary to a region of the RNA polymerase beta subunit *locus* capable of identifying MTBC members.²⁰ The method relies on the hybridisation between the Au-nanoprobe and the target sequence from the pathogen. In this non-cross-linking assay, the aggregation of the AuNPs is induced by salt addition and the presence of a complementary target prevents Au-nanoprobe aggregation and the solution remains red; the absence of a complementary target does not prevent Au-nanoprobe aggregation, which results in a visible colour change from red to blue. This low-complexity

assay was subsequently used for the detection of MTBC specimens and mutations associated with antibiotic resistance in clinical specimens with remarkable sensitivity in just a few hours.^{20,22,24}

Here, we report on the integration of this colorimetric Au-nanoprobe assay with a paper-platform that allows colour development and a simple data analysis tool capable of the specific detection of MTBC members. The Au-nanoprobe hybridisation to the specific DNA target sequence yields an intensive red-colour that can be easily differentiated from a non-complementary sequence, which yields a blue coloured solution. The wax printed 384 well plate is impregnated with a pre-determined concentration of salt (MgCl_2) capable of inducing Au-nanoprobe aggregation, thus yielding a colorimetric discrimination indicating the presence of the specific DNA target. Because of the white background of the paper, the colour contrast is greatly improved without the need for expensive constituents. We further demonstrate the integration of this paper-platform with a smartphone and a simple data analysis tool that together are capable of quantifying the colorimetric changes on the paper plate system and transmitting the metadata to a centralised off-site laboratory (Fig. 1). This principle can be extended to any other standard mobile imaging device with GPS capability. This integrated *Gold on Paper* platform was then used

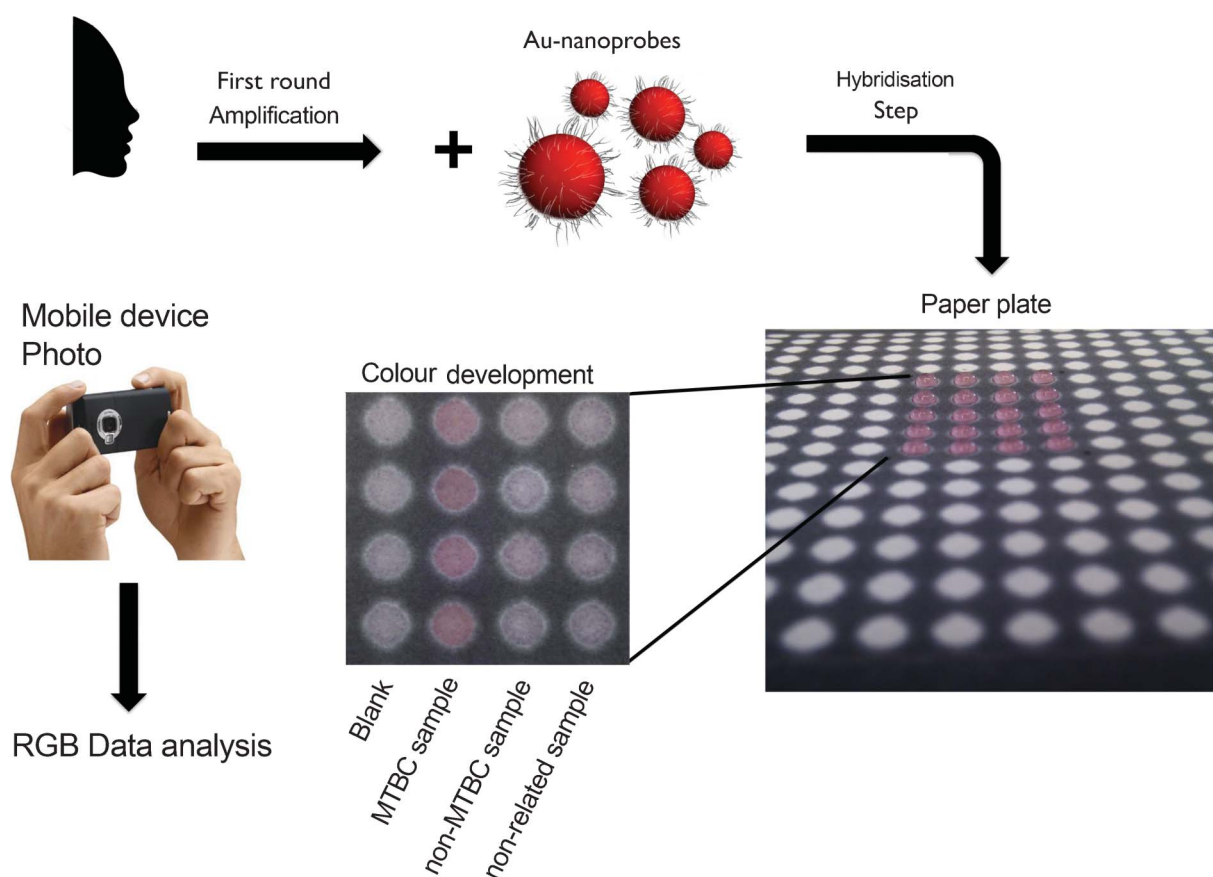


Fig. 1 Au-Nanoprobe strategy for the detection of MTBC members. Schematic representation of the detection with gold nanoprobes. The colorimetric assay consists of visual comparisons of test solutions after salt induced Au-nanoprobe aggregation on a $[\text{MgCl}_2]$ impregnated paper plate: MTBC Au-nanoprobe alone—Blank; MTBC Au-nanoprobe in the presence of MTBC sample—*M. tuberculosis*; MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-MTBC sample; and MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-complementary sample—non-related. After colour development a photo of the paper plate is captured and RGB image analysis is performed.

for the identification of DNA from MTBC. This novel integrated platform—*Gold on Paper*—holds great promise for a fast and cheap molecular diagnostics strategy for TB diagnostics at point-of-need. For the first time, a nanodiagnostics approach for the molecular characterisation of TB is combined with a simple paper based platform for use as a tool for the unequivocal identification of *Mycobacterium tuberculosis* in an easy to use lab-on-paper strategy. The integration of the *Gold on Paper* platform with the data analysis strategy on a mobile device may be proven as an effective simple approach to TB molecular screening in less than 2 h.

2 Materials and methods

2.1 Gold on Paper platform preparation

Starting from sheets of a cellulose substrate Whatman No. 1 Chromatography paper (Whatman International Ltd., Floram Park, NJ, USA), A5 standard format (210 × 148 mm) sheets were cut. This paper size fits directly into the manual feed tray of a commercial solid ink printer (Xerox ColorQube 8570, Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA) designed to print a wax based ink, originating hydrophobic barriers.¹³ Paper microplates were designed with a standard 384 plate format in Microsoft Office Visio® (Microsoft Corporation, US). All the measurements were taken from the “Microplate Dimensions Guide, Compendium of Greiner Bio-one microplates” (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). The printed pattern of a 384 microplate was placed on a hot plate (Heidolph MR Hei-Tec, Schwabach, Germany) at 140 °C for 2 min, allowing the wax to melt and spread vertically through the whole thickness of the paper, creating the desired hydrophobic pattern—see the ESI for production and characterisation.†

Each well was impregnated with 1 µL of a 0.12 M MgCl₂ solution (revelation agent) and allowed to dry at 25 °C for 10 min. The final microplates were stored at 25 °C, and wrapped in aluminium foil until use.

2.2 Scanning electron microscopy (SEM) analysis

Samples were mounted on aluminium stubs with carbon tape and coated with an 8 nm thick palladium-gold film in a Quorum Q150T ES sputtering system. The sample surface was observed in a Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB workstation, using an accelerating voltage of 2 KeV with an aperture size of 30 microns.

2.3 Sample DNA preparation

A specific Polymerase Chain Reaction (PCR)-amplified 395 bp fragment of the *M. tuberculosis* RNA polymerase β-subunit (*rpoB*-GenBank accession no. L27989) gene suitable for detection of MTBC members was used as target for the Au-nanoprobe detection assay. PCR amplification was performed in a final volume of 50 µL containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.2 mM MgCl₂, 200 mM of each dNTP, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Europe, GmbH), 10 pmol of each primer (P1 5'-GAG AAT TCG GTC GGC GAG CTG ATC C-3'; P2 5'-CGA AGC TTG ACC CGC GCG TAC ACC-3')^{3,25} involving 35 cycles of 45 s denaturation at 94 °C, 45 s annealing at 58 °C followed by 45 s

extension at 72 °C. Amplification was observed by 1% Agarose gel electrophoresis and was further confirmed by direct sequencing using Big Dye v3.1 Terminator technology (STABVIDA, Almada, Portugal). DNA samples isolated from *M. tuberculosis* and non-MTBC Mycobacteria cultures were used as positive MTBC (complementary) and non-MTBC (non-complementary) samples, respectively. DNA from an unrelated organism was used as non-related. The non-MTBC sample is derived from a clinical isolate from *Mycobacterium kansasii*, whose sequence differs from that of the *M. tuberculosis rpoB* target region by a single nucleotide (see the ESI†).

2.4 Au-nanoprobe synthesis and characterisation

Gold nanoparticles, with an average diameter of ~14 nm, were synthesised by the citrate reduction method described by Lee and Meisel.²⁶ Briefly, 250 ml of 1 mM HAuCl₄ was heated while stirring, 25 ml of 28.8 mM sodium citrate was added, and the solution was refluxed for 15 min. Afterwards, the solution was left at room temperature to cool down. The gold nanoprobes were prepared by incubating the thiol-modified oligonucleotides with the AuNPs for 16 h. The solution was washed with 10 mM phosphate buffer (pH 8), and increasing salt concentration, in order to reduce non-specific binding between the thiol-modified oligonucleotides and the AuNPs. The solution was centrifuged, the resulting pellet resuspended in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and stored in the dark at 4 °C until further use.²⁷

A comparative analysis of *rpoB* gene sequences from mycobacteria was performed through sequence alignment using Geneious v.4.7.6 software. Probe specificity was tested *in silico* using BLAST tools from GenBank. The MTBC probe 5'-thiol-GAT CGC CTC CAC GTC C-3' (STABVIDA, Portugal) was then used to functionalise the AuNPs as previously described.^{20,22} For target discrimination assessment in assay calibration, non-modified synthetic oligonucleotides were used, MTBC sequence 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA CGT GGA GGC GAT C-3'; and non-MTBC 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA TCG CCT CCA CGT C) positive (complementary) and negative (non-complementary), respectively. These calibration data were used to assess the probe specificity in the presence of the DNA sample.

2.5 Au-nanoprobe colorimetric assay

The 395 base pair (bp) PCR products were ethanol precipitated, resuspended in deionised water and used for the Au-nanoprobe assay (see also the ESI†). Each colorimetric assay was performed in a total volume of 30 µL, with Au-nanoprobes at a final concentration of 2.5 nM in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl and target DNA at a final concentration of 30 µg mL⁻¹, as previously described.^{20,22} The assay involves the visual comparison of a “Blank” (without DNA), 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl; “Probe”, 10 mM phosphate buffer (pH 8); and the samples. After 10 min at 95 °C for target DNA denaturation, the mixtures were allowed to stand for 30 min at room temperature and MgCl₂ was added-[MgCl₂] = 0.02 M for the MTBC probe. After 30 min at room temperature, for colour development, the mixtures and the blank were assayed by UV/visible spectroscopy in a microplate reader (Tecan Infinite M200).

For assaying with the *Gold on Paper* platform, a total reaction mixture of 5 μL was used with 2.5 nM Au-nanoprobe in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl and target DNA at a final concentration of 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. After 10 min of denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$, the mixtures were allowed to stand for 10 min at room temperature and spotted onto the well on the paper plate. After 45 min at room temperature for colour development, the paper plate was photographed with a mobile device and RGB analysis was performed.

2.6 Data acquisition and analysis

The colour pattern on the *Gold on Paper* was captured with an HTC Desire android smartphone with a 5 megapixel camera (2592 \times 1944 pixels) with autofocus. Photos were taken with artificial white light without flash. Blank test spots with 10 mM phosphate buffer (pH 8), were used to normalise the data for light conditions. The digitalised data were then analysed without further manipulation with a free RGB analysis application (ColorPikr, WiseClue) and transmitted via a 3G network to a personal computer for image processing with ImageJTM. Each assay was repeated at least three times and on four different paper micro well plates.

A one-way ANOVA analysis, with Tukey's multiple comparison test, using GraphPad (San Diego, CA) was used to validate the results. The one-way analysis of variance was used to test for differences between two groups of data (Blank, MTBC sample, non-MTBC sample and non-related). Additional statistical analysis of the differences was carried out using Tukey's multiple comparison procedures.

3 Results and discussion

The *Gold on Paper* diagnostics strategy is depicted in Fig. 1. First, the Au-nanoprobe is incubated with the sample DNA for molecular recognition to take place. Then, the reaction mixture is spotted onto the paper microplate well for colour revelation. The colour change on the spots is then recorded by means of a camera on the generic mobile device and subsequently analysed via RGB.

To develop the *Gold on Paper* platform, we first optimised the Au-nanoprobe detection scheme for specific identification of DNA from *M. tuberculosis* (MTBC member). A specific Au-nanoprobe, targeting the *rpoB* locus shared by all MTBC members, was synthesised and optimised for use in the non-cross-linking detection method previously reported by our group.^{20,22,28}

A minimum of three individual parallel hybridisation experiments targeting the 395 bp amplicons derived from the *rpoB* gene were performed. The Au-nanoprobe solutions exhibit a strong red colour derived from the localised SPR of the AuNPs. Upon salt induced aggregation, the presence of the complementary target sequence protects the Au-nanoprobe against aggregation and the solution remains red; the absence of a complementary DNA target sequence to that of the Au-nanoprobe results in extensive aggregation and the solution turns blue due to the red-shift of the SPR band. Based on the UV/visible spectra obtained after salt addition, the ratio between the absorbance at 526 nm (contribution of the non-aggregated fraction of Au-nanoprobe) and absorbance at 600 nm (contribution from the aggregated

fraction of Au-nanoprobe) was calculated (Fig. 2A). A ratio of 1 may be considered as the point of equilibrium between non-aggregated and aggregated nanoprobe, hence the threshold to respectively discriminate between positive and negative samples. This way, it was possible to identify samples containing the target sequence.

Following calibration, the minimum amount of salt (MgCl_2) required for the aggregation of the Au-nanoprobe used in the calibration assay was impregnated in each well of the paper plate platform. The wax used for production of the paper microplate template retains the Au-nanoprobe solution and, because each well was impregnated with a probe specific concentration of salt, allows aggregation to occur. Paper-based microplates are well suited for work with small volumes of sample: 5 μL of solution is sufficient to uniformly fill a well in the 384 microplate standard format, while a plastic plate requires a minimum of 15 μL to fill the bottom of the well. This approach gives accurate results when detecting MTBC members, uses small volumes of sample (5 μL), allowing for a reduction of 6 times the total amount of probe and sample. After sample hybridisation with Au-nanoprobe, the 5 μL reaction volume was added to the paper microplate platform for colour development. After 45 min for solvent evaporation and colour development, a plate image was captured with a smartphone and the ratio between the red RGB channel and the blue RGB channel calculated—Fig. 2B and 2C (see also the ESI†).

The colorimetric data was then recorded with a smartphone and analysed directly on the device without further manipulation or was analysed after sending the information via 3G to a laptop for imaging processing (Fig. 2). The same samples were also evaluated in the traditional microplate reader setup. For all methodologies, the Au-nanoprobe system was capable of specific identification of *M. tuberculosis* DNA ($p < 0.0001$) with little variability between the methods and no loss of sensitivity and specificity when performing the colour analysis directly on the mobile device (see the ESI†).

The Au-nanoprobe assay is capable of discriminating the presence of the MTBC sample DNA down to a concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (i.e. 41 and 246 pmol of target for *Gold on Paper* and a microplate reader, respectively). The *Gold on Paper* platform shows a response to increasing sample DNA concentration similar to that of the microplate reader. However, the difference between positive and negative is less intense, although clearly statistically significant (see the ESI†).

Paper is a good medium for colour based spot tests as it provides a strong contrast and, due to the high surface-to-volume ratio, facilitates the accelerated evaporation of solutions and results in concentrated analytes. As can be seen in Fig. 2, the microplate signal is more intense than that of the *Gold on paper* platform. This can be easily explained since a smaller amount of Au-nanoprobe is being used. In fact, the 5 μL reaction volume (versus 30 μL on the microplate reader) allows for complete and uniform coverage of the entire test zone with sharp colour change, enabling direct visual detection. This slight decrease in signal is greatly compensated by the simplicity of the detection without loss of sensitivity, and does not require a microplate reader or UV/vis spectrophotometer.

Smartphone devices eliminate the need to transmit data to achieve the result, allowing a fast and reliable analysis. Effective

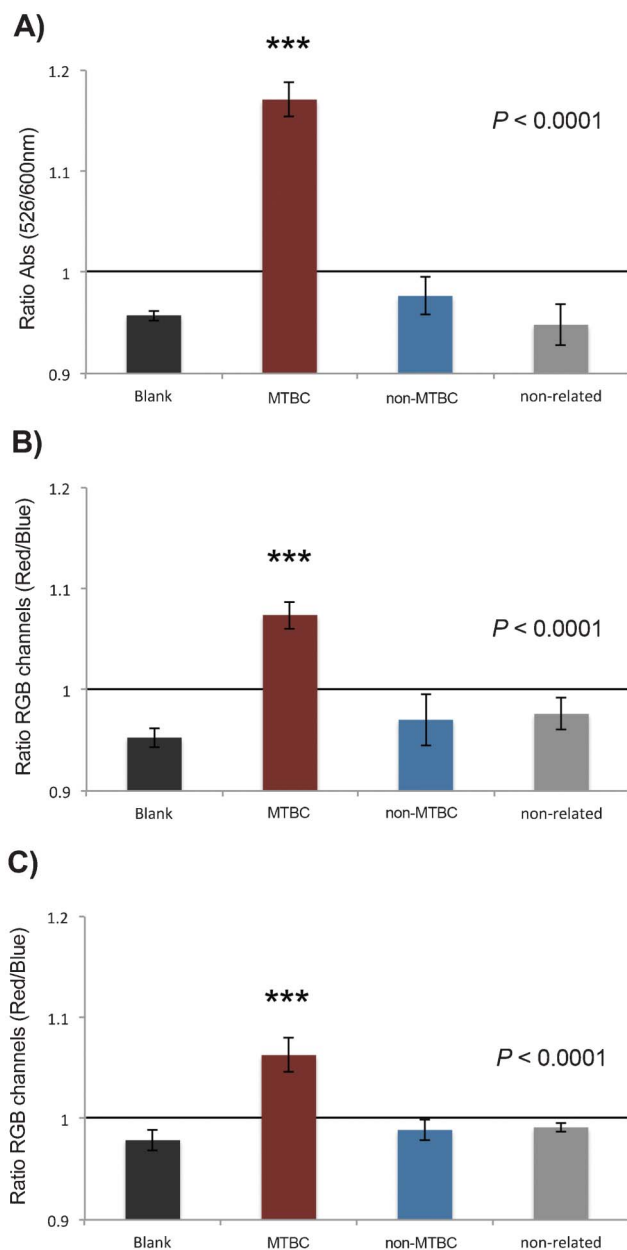


Fig. 2 Au-nanoprobe assay for MTBC detection: (A) MTBC standard assay performed in a microplate reader. Nanoprobe aggregation as measured by the ratio of aggregation (ratio of SPR intensity at 526 and 600 nm) for the assay mixtures—2.5 nM Au-nanoprobe, 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and specific PCR amplified DNA at a final concentration of $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ in a final volume of $30 \mu\text{L}$. Sample detection, after 30 min incubation with $[\text{MgCl}_2] = 0.02 \text{ M}$; (B) MTBC assay performed in the paper microplate, Nanoprobe aggregation as measured by image RGB analysis. Ratio of aggregation calculated in ImageJ™ on a PC (ratio of average intensity of the red and blue channels) for the assay mixtures. (C) MTBC assay performed in the paper microplate, nanoprobe aggregation as measured by image RGB analysis. Ratio of aggregation calculated in the smartphone (ratio of average intensity of the red and blue channels) for the assay mixtures. Paper microplate assay performed with—2.5 nM Au-nanoprobe, 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and sample DNA at a final concentration of $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ in a final volume of $5 \mu\text{L}$ per test. Image captured after 45 min. The bars represent the average of three independent measurements and the error bars indicate standard

deviation. The horizontal line represents the threshold of 1 considered for discrimination between positive and negative. Statistical analysis was performed using Prism 5 Graph Pad, using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; *** = $p < 0.0001$, $n = 3$.

TB diagnostics are achieved using *Gold on Paper* coupled to a mobile device and operational remote assessment is possible via RGB scrutiny.

After colour development three samples (paper microplate, MTBC positive and MTBC negative) were characterised via scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 3). Results show a clear difference in the Au-nanoprobe dispersion in the presence of MTBC and non-MTBC target samples, the latter showing extensive Au-nanoprobe aggregation on the paper fibres. As shown above, these results show direct correlation with the colour captured in the digitalised images.

4 Conclusions

Serious efforts have been directed to provide robust, yet simple and portable molecular diagnostic platforms for use at peripheral laboratories and/or point-of-need. This is particularly relevant when assembling diagnostics platforms for worldwide epidemics with high numbers of affected people in less equipped regions of the globe, as in the case of tuberculosis. Here we show the potential of the *Gold on Paper* platform for TB molecular diagnostics that could be proven as a useful tool in the fight against TB. *Gold on Paper* is the working concept of integrating a paper microwell platform and a biomolecular detection scheme based on Au-nanoprobes. *Gold on Paper* was shown to be capable of efficiently detecting MTBC members directly and, by means of a smartphone device, analysing data on the spot while maintaining sensitivity and specificity. We have demonstrated that *Gold on Paper* detection is easy to perform without the need for expensive and complex laboratory set ups. Using *Gold on Paper*, it is possible to attain a positive identification of the pathogen within one hour, which via the use of a generic “smart” mobile device allows for complete analysis at a peripheral laboratory. We demonstrate that smartphones can be used as tools for data acquisition and handling in paper-based bioassays, eliminating the need to transmit data to get the results. Ultimately, we envisage a software package that collects and analyses the results on-site, and transmits the collected data to a centralised infrastructure. One issue hindering full implementation into remote locations may be the need for DNA sample preparation that now relies on PCR amplification, which is time consuming and costly. Nevertheless, efforts are being made to optimise this system via the removal of this limiting step. The limitation imposed by the DNA sample preparation is greatly overcome by the potential use of this methodology to identify and characterise the molecular signatures involved in antibiotic resistance.²² This way, the additional level of information will be of most value to implement and/or adjust therapy. The whole process, including the PCR amplification step, occurs under 2h30, which is considerably faster than traditional methods.

Before *Gold on Paper* can be translated into clinics and to the point-of-need, extensive validation is still required. Also, the PCR step ought to be removed and/or modified without loss of

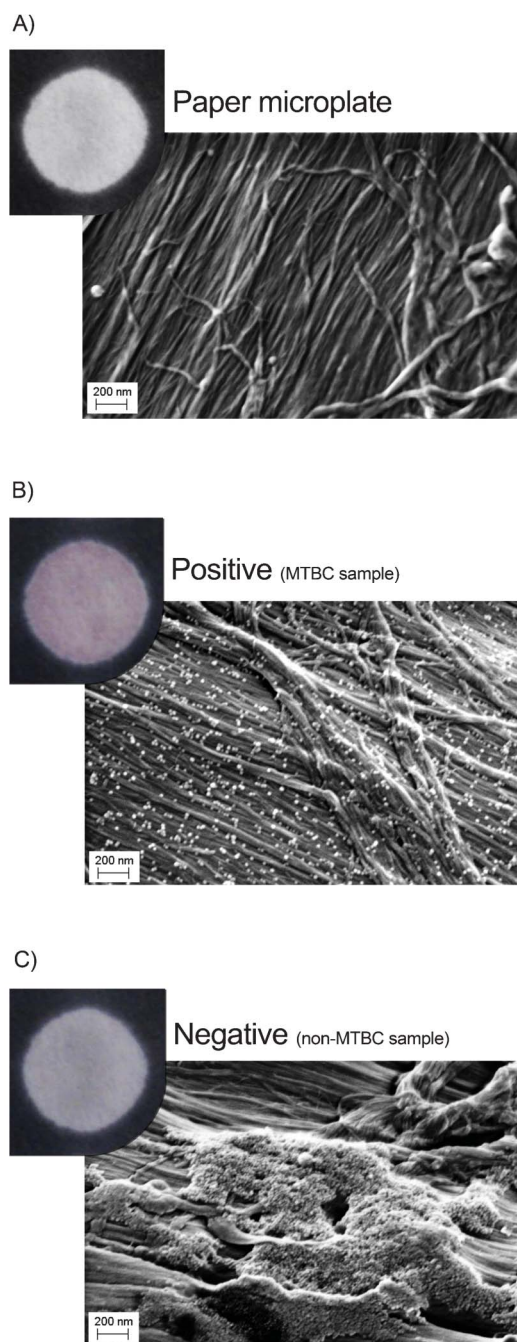


Fig. 3 Gold on Paper molecular diagnostics. Photographic captures of the detection on each well together with SEM images after the detection procedure. (A) Standard paper microplate well; (B) identification of a positive sample for *M. tuberculosis* complex (MTBC) showing the typical red colour on the spot. SEM image showing non-aggregated Au-nanoprobes; (C) Negative sample (non-MTBC DNA). SEM shows the extent of Au-nanoprobe aggregation on paper.

sensitivity, for example by including a paper microfluidics system for sample preparation.

Also, because we used paper as the platform for spotting and development of the aggregation assay, using SEM analysis it was possible to provide additional evidence of the differential aggregation events taking place in solution. For the first time,

irrefutable evidence of the mechanism underlying the target-mediated aggregation of Au-nanoprobes *via* the non-cross-linking approach mechanism has been provided. In fact, the presence of the specific target prevents against salt induced aggregation and, as result, the solution retains the original colour; conversely, aggregation of the Au-nanoprobes upon salt addition occurs because no target is present to hybridise to the nanoprobe and hamper aggregation.

Based on *Gold on Paper* it is possible to perform the biorecognition and detection event and transmit digital information over existing communication channels, combined with geolocation metadata inserted into the captured digital images. This integrated diagnostics scheme can then forward the attained data to a centralised off-site server allowing for monitoring of TB in real-time that could be proven to be extremely useful in remote areas of the globe lacking resources. Future studies will be carried out to optimise the methodology towards validation, direct application to clinical samples, and to extend the range of applications to mutations associated with drug resistance.

Acknowledgements

This work was partially supported by the European Commission under project INVISIBLE (FP7 ERC grant n° 228144), and FCT/MEC: Strategic Projects PEst-C/CTM/LA0025/2011 and PEst-OE/SAU/UI0009/2011; Projects PTDC/EEA-ELC/099490/2008 (paper@), PTDC/SAU-BEB/098125/2008 (BloodFET), PTDC/CTM/NAN/109877/2009, PTDC/CVT/111634/2009. B. Veigas was supported by FCT/MEC (SFRH/BD/78970/2011).

References

- 1 World Health Organization (WHO), *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*, WHO, Geneva, Switzerland, 2011, ISBN 978 92 4 156438 0.
- 2 M. Barnard, H. Albert, G. Coetzee, R. O'Brien and M. E. Bosman, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2008, **177**, 787–792.
- 3 H. De Beenhouwer, Z. Lhiang, G. Jannes, W. Mijs, L. Machtelinckx, R. Rossau, H. Traore and F. Portaels, *Tubercle Lung Dis.*, 1995, **76**, 425–430.
- 4 M. Viveiros, M. Martins, I. Couto, L. Rodrigues, D. Machado, I. Portugal and L. Amaral, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2010, **8**, 465–480.
- 5 D. Hillemann, M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter and S. Niemann, *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 3699–3703.
- 6 W. G. Park, W. R. Bishai, R. E. Chaisson and S. E. Dorman, *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 4750–4752.
- 7 S. Su, R. Nutiu, C. D. Filipe, Y. Li and R. Pelton, *Langmuir*, 2007, **23**, 1300–1302.
- 8 R. Tanaka, T. Yuhi, N. Nagatani, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1414–1420.
- 9 A. Y. Kolosova, L. Sibanda, F. Dumoulin, J. Lewis, E. Duveiller, C. Van Peteghem and S. De Saeger, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **616**, 235–244.
- 10 D. A. Bruzewicz, M. Reches and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3387–3392.
- 11 A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas III, H. Sindi and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3699–3707.
- 12 E. Carrilho, S. T. Phillips, S. J. Vella, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 5990–5998.
- 13 E. Carrilho, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7091–7095.
- 14 Y. H. Ngo, D. Li, G. P. Simon and G. Garnier, *Langmuir*, 2012, **28**, 8783–8790.
- 15 W. Zhao, M. M. Ali, S. D. Aguirre, M. A. Brook and Y. Li, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8431–8437.
- 16 H. M. E. Azzazy, M. M. H. Mansour and S. C. Kazmierczak, *Clin. Chem.*, 2006, **52**, 1238–1246.

- 17 M. Das, G. Sumana, R. Nagarajan and B. D. Malhotra, *Thin Solid Films*, 2010, **519**, 1196–1201.
- 18 K. K. Jain, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 2002–2009.
- 19 H. M. E. Azzazy and M. M. H. Mansour, *Clin. Chim. Acta*, 2009, **403**, 1–8.
- 20 P. V. Baptista, M. Koziol-Montewka, J. Paluch-Oles, G. Doria and R. Franco, *Clin. Chem.*, 2006, **52**, 1433–1434.
- 21 B. Veigas, G. Doria and P. V. Baptista, in *Nanodiagnosics for Tuberculosis, Understanding Tuberculosis-Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis*, ed. Dr Pere-Joan Cardona, InTech, 2012, ch. 12, pp. 257–276.
- 22 B. Veigas, D. Machado, J. Perdigão, I. Portugal, I. Couto, M. Viveiros and P. V. Baptista, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 5101–5108.
- 23 G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, J. Rosa and P. V. Baptista, *Sensors*, 2012, **12**, 1657–1687.
- 24 L. B. Silva, B. Veigas, G. Doria, P. Costa, J. Inácio, R. Martins, E. Fortunato and P. V. Baptista, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 2012–2017.
- 25 P. C. Soo, Y. T. Horng, K. C. Chang, J. Y. Wang, P. R. Hsueh, C. Y. Chuang, C. C. Lu and H. C. Lai, *Mol. Cell. Probes*, 2009, **23**, 240–246.
- 26 P. C. Lee and D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3391–3395.
- 27 J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 1959–64.
- 28 P. V. Baptista, G. Doria, D. Henriques, E. Pereira and R. Franco, *J. Biotechnol.*, 2005, **119**, 111–117.